



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA

CENTRO REGIONAL DAS BEIRAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Estabelecimento de protocolos de diagnóstico de agentes microbianos
associados à periodontite.**

*Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para a obtenção
do grau de mestre em Medicina Dentária*

Por:

Ana Bárbara da Silva Bessa

Setembro 2011



UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA

CENTRO REGIONAL DAS BEIRAS

DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**Estabelecimento de protocolos de diagnóstico de agentes microbianos
associados à periodontite.**

*Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para a obtenção
do grau de mestre em Medicina Dentária*

Orientador: Professora Doutora Maria José Correia

Co-orientador: Mestre Nuno Malta Santos

Por:

Ana Bárbara da Silva Bessa

Setembro 2011

“Ciência sem consciência não é senão a ruína da alma”

(François Rebelais)

Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Maria José Correia, por toda a sua dedicação, disponibilidade e conhecimento transmitido.

Ao meu co-orientador, Mestre Nuno Malta Santos, pelos conselhos e disponibilidade.

Ao Professor Doutor Jorge Leitão, Coordenador do Mestrado Integrado em Medicina Dentária da Universidade Católica Portuguesa, pelo exemplo de competência e transmissão de conhecimentos científicos.

Aos meus pais e irmã pelo amor incondicional.

À minha binómia e mais que tudo amiga Diana Isabel Amaral, pela amizade, companheirismo e espírito crítico demonstrado ao longo destes 5 anos.

A todos os meus amigos e colegas que me acompanharam neste percurso.

Índice de Abreviaturas

ADN - ácido desoxirribonucleico

DNA - *deoxyribonucleic acid*

PCR - reacção em cadeia de polimerase

PCR - *Polymerase Chain Reaction*

ARN - ácido ribonucleico

RNA – *Ribonucleic acid*

Min - minutos

Cº - graus centígrados

MM-marcador molecular

TE-Tris-EDTA

TAE - Tris-Acetato-EDTA

Tris - tris(hidroximetil)aminometano

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

IP- índice de placa

BOP- *bleeding on probing*(sangramento à sondagem)

MIMD- Mestrado Integrado em Medicina Dentária

CDU- Clínica Dentária Universitária

UCP/ CPU- Universidade Católica Portuguesa

PMN- Neutrófilos polimorfonucleares

MMP- Metaloproteinases da matriz

Resumo

As doenças periodontais crónicas são das patologias infecciosas de etiologia bacteriana mais prevalentes por toda a humanidade, causadas essencialmente por bactérias patogénicas que crescem em biofilme. A identificação de microrganismos específicos como o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e a *Porphyromonas gingivalis*, pode contribuir para a determinação do risco de desenvolver doença periodontal e ainda conhecer o comportamento da microflora após terapia periodontal.

O presente trabalho tem como objectivo verificar a exequibilidade da realização de um exame de diagnóstico adicional nos laboratórios da UCP. Esse exame consiste na análise microbiológica da presença de 2 agentes microbianos associados à periodontite. Fez-se a avaliação de procedimentos de colheita da amostra, procedimento de extracção inicial de ADN, procedimentos de reacção de PCR, avaliação da satisfação dos solicitantes das análises relativamente aos procedimentos de recolha e utilização dos resultados no diagnóstico periodontal.

Foi elaborado um protocolo de diagnóstico de agentes microbianos associados à periodontite, que englobou várias fases desde a elaboração da folha de requisição, protocolo de colheita, protocolo de extracção de ADN e protocolo de PCR específico para cada microrganismo. Foram colhidas e analisadas 59 amostras em 20 pacientes por 17 operadores na consulta de Periodontologia do MIMD da UCP. Os operadores que participaram na recolha destas amostras, preencheram um questionário que permitiu analisar globalmente o protocolo fornecido e a sua utilidade na óptica da comunidade académica da CDU.

Não se conseguiu comprovar a exequibilidade do protocolo nos laboratórios da UCP uma vez que todas as amostras se revelaram negativas para os 2 microrganismos. Foram considerados alguns factores que poderiam justificar o facto de todas as amostras terem sido negativas, nomeadamente: funcionamento da reacção de PCR (pela inclusão de um controlo positivo em todas as amostras); presença de ADN (pela visualização em gel de agarose de todas as amostras após o processo de extracção); verificação da origem do ADN das amostras (pela aplicação de *primers* universais bacterianos). Os resultados de cada uma das destas avaliações conduziram a algumas alterações nos procedimentos de recolha das amostras e isolamento do ADN. São apresentadas

justificações para os resultados e sugeridas mais alterações para futuras investigações da presença destes microrganismos em bolsas periodontais.

Palavras-chave: Doença periodontal, Diagnóstico microbiológico, PCR, Biofilme oral.

Abstract

Chronic periodontal diseases are one of the infectious conditions with bacterial etiology more prevalent in all mankind, mainly caused by pathogenic bacteria that grow in biofilms. The identification of specific microorganisms such as *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*, can contribute to determine the risk of developing periodontal disease; to know the composition of the biofilm in periodontal health and also understand the behavior of the microflora after periodontal therapy.

The present work aims to verify the feasibility of conducting an additional diagnostic exam in the UCP laboratories. This exam consists in the microbiological analysis of the presence of 2 microbial agents associated with periodontitis. The feasibility test of this exam consisted in the evaluation of procedures for sample collection, procedures for initial DNA extraction, PCR reaction procedures for results optimization, evaluation of the analysis requesters satisfaction about the collection procedures and use of results in periodontal diagnosis.

To achieve the objectives proposed, a diagnostic protocol of microbial agents associated with periodontitis was developed, which included several stages from the elaboration of the request sheet, collection protocol, DNA protocol extraction and PCR protocol specific for each microorganism. To test the feasibility of the protocols, 59 samples, collected from 20 patients consulting the periodontology MIMD of CPU were analyzed. The operators, who participated in collecting these samples, completed a questionnaire that allowed analyzing globally the protocol provided and its usefulness in terms of the academic community of the CDU.

We were unable to prove the feasibility of the protocol in the laboratories of the CPU since all samples proved negative for the two microorganisms. We considered some factors that could justify the fact that all samples were negative including: operation of the PCR reaction (by adding a positive control in all samples), presence of DNA (by agarose gel visualization of all samples after the extraction process), verification of the origin of DNA samples (by applying universal bacterial *primers*).

The results of each of these assessments lead to some changes in the procedures of collecting samples and DNA isolation. Justifications are given for the results and suggested further changes to future investigations of the presence of these microorganisms in periodontal pockets.

Keywords: Periodontal disease, Microbiological diagnosis, PCR, Oral biofilm.

Índice

I.	Introdução	1
1.	Revisão Bibliográfica	3
1.1.	O periodonto	3
1.1.1.	Estrutura e função	3
1.2.	A doença periodontal	4
1.2.1.	Definição e conceito	4
1.2.2.	Classificação das doenças periodontais	5
1.2.3.	A doença periodontal como doença multifactorial	5
1.3.	Aspectos microbiológicos da doença periodontal	6
1.3.1.	Composição e formação do biofilme subgengival	6
1.3.2.	Microflora associada à periodontite	8
1.3.2.1.	Complexos microbianos	9
1.3.3.2.	Etiopatogenia	10
1.3.3.3.	Factores de virulência	17
1.3.3.4.	Equilíbrio hospedeiro-hóspede	17
1.4.	Métodos de diagnóstico microbiológico das doenças periodontais	18
1.4.1.	Relevância prática do diagnóstico microbiológico	18
1.4.2.	Cultura microbiológica	19
1.4.3.	PCR , Real Time-PCR e hibridação checkerboard DNA-DNA	20
II.	Objectivos	25
III.	Materiais e métodos	27
IV.	Resultados e Discussão	31
V.	Conclusões	39
VI.	Bibliografia	41
VII.	Anexos	a
	Anexo I	a
	Anexo II	b
	Anexo III	c
	Anexo IV	d
	Anexo V	e
	Anexo VI	f
	Anexo VII	h
	Anexo VIII	i
VIII.	Índice de Figuras e Tabelas	o

**Estabelecimento de um protocolo de diagnóstico de agentes
microbianos associados à periodontite**

I. Introdução

A palavra diagnóstico em Medicina tem como significado o conhecimento de uma doença pelo estudo dos seus sintomas e pela análise dos vários exames efectuados, ou seja, é o conjunto de elementos que permite determinar a existência de uma doença. Quando nos referimos ao diagnóstico periodontal, este adquire como significado o reconhecimento de uma alteração da saúde do periodonto.

Nas aulas de Periodontologia da Universidade Católica Portuguesa (UCP), o diagnóstico periodontal inicia-se com o preenchimento minucioso da história clínica, exame radiológico e exame clínico em que são quantificados o índice de placa (IP) índice de sangramento à sondagem (BOP) e a profundidade de sondagem (PD).

Com este trabalho pretende-se verificar a exequibilidade da realização de um exame complementar de diagnóstico nos laboratórios da UCP. Esse exame consiste na análise microbiológica da presença de agentes microbianos associados à periodontite.

1. Revisão Bibliográfica

1.1.O periodonto

1.1.1.Estrutura e função

Para se conseguir compreender as mudanças fisiológicas e patológicas do periodonto, é necessário conhecer a estrutura biológica dos tecidos periodontais.

O termo periodonto engloba quatro tipos diferentes de tecidos, moles e duros, tais como: gengiva, ligamento periodontal, osso alveolar e cimento. Estes tecidos são individualizados e diferenciados em várias estruturas.

A gengiva, é o componente mais periférico do periodonto, sendo uma porção da mucosa oral, esta começa na linha mucogengival e cobre toda a parte coronal do processo alveolar, no palato não existe linha mucogengival, daí se considerar que a gengiva seja uma porção da mucosa oral queratinizada não móvel (1).

Podemos ainda distinguir, a gengiva marginal livre, gengiva aderida e a gengiva interdentária (1).

O ligamento periodontal é uma estrutura de tecido conjuntivo que circunda a raiz do dente e a liga ao osso alveolar. Este é constituído por fibras de tecido conjuntivo, células epiteliais, vasos sanguíneos e fibras nervosas (2-4).

As fibras principais do ligamento periodontal são distribuídas por 6 grupos: da crista alveolar, transeptais, horizontais, oblíquas, apicais e interradiculares. As porções terminais das fibras principais, que se inserem no osso e no cimento são chamadas fibras de *Sharpey* (2).

O osso alveolar, ou processo alveolar, da maxila e mandíbula está sempre associado à presença de dentes. Este forma-se com o início da erupção do dente, e sofre atrofia quando existe perda de peças dentárias. Podemos discriminar três tipos de osso diferentes no processo alveolar: osso alveolar propriamente dito, osso trabecular e osso compacto.

O cimento do ponto de vista anatómico faz parte do dente mas também do periodonto, trata-se de um tecido mesenquimatoso calcificado que forma a camada mais externa da raiz anatómica (5).

1.2.A doença periodontal

1.2.1.Definição e conceito

Doença periodontal, é uma expressão genérica utilizada para designar as afecções do periodonto, ou seja, as doenças que afectam as estruturas que rodeiam o dente, sendo estas a gengivite e a periodontite nas suas diversas formas. As inflamações periodontais crónicas destrutivas – Periodontites – são uma das doenças com uma componente bacteriana, mais disseminadas por toda a humanidade, sendo a periodontite crónica encontrada na população adulta, a mais frequente (6).

A doença periodontal actualmente é abordada como uma doença de componente multifactorial, sendo a sua etiologia complexa e não totalmente estabelecida (7). Nos anos 60, considerava-se que: todos os indivíduos teriam a mesma susceptibilidade para periodontites severas; a gengivite evoluía na grande maioria para periodontite com consequente perda de suporte ósseo e eventual perda de peças dentárias; que a susceptibilidade para a doença periodontal aumentava com a idade sendo na altura, esta a causa mais prevalente para o edentulismo a partir dos 35 anos (8). Os motivos apontados para que a gengivite evolua para uma periodontite incluem, a proliferação de microrganismos patogénicos, a sua capacidade de invasão de tecido, o seu potencial patogénico, e a capacidade de resposta do hospedeiro. Contudo, o peso destes factores não se encontra totalmente definido e sabe-se também que nem todos os locais com gengivite evoluem para periodontite (7).

A maior parte dos microrganismos colonizadores da cavidade oral, são comensais, encontrados em condições compatíveis com saúde periodontal e também em presença de doença (9-12).

Um doente não tratado que apresente uma gengivite pode evoluir, rápida ou lentamente para uma periodontite, em que se verifica perda de suporte (8). Contudo, nem todas as gengivites evoluem para periodontites, a prevenção da gengivite na população ou o controlo individual continua a ser o primeiro passo na prevenção da periodontite (8).

Os parâmetros clínicos mais usados para o diagnóstico da periodontite são a perda de suporte do dente e a profundidade de sondagem nas bolsas periodontais. O

método considerado como *gold standard* no diagnóstico é o cálculo da perda de suporte (calculado através do somatório da profundidade da bolsa com o valor da recessão). Contudo, estes dados reflectem um cálculo sobre o passado da doença naquele local, não nos dando informação sobre o actual estado da doença (8).

1.2.2. Classificação das doenças periodontais

Quando realizamos um diagnóstico temos de recorrer obrigatoriamente a critérios de exclusão e de inclusão das diversas patologias existentes, para tal é necessário que essas patologias se encontrem catalogadas e as doenças periodontais não fogem a essa regra, pois diferentes formas de doença periodontal implicam abordagens terapêuticas diferentes, variando desde, a destartarização com ultra-sons, raspagem e alisamento radicular e antibioterapia entre outras. Actualmente, a classificação das doenças periodontais aceite pela Academia Americana de Periodontologia apresenta 7 categorias, descritas no anexo IX, resultantes do *workshop* conjunto da Academia Americana de Periodontologia e da Federação Europeia de Periodontologia, que decorreu em 1999 – *Workshop for the Classification of Periodontal Diseases and Conditions* (13; 14).

1.2.3. A doença periodontal como doença multifactorial

Considera-se a doença periodontal como uma doença multifactorial tendo como causa inicial a formação do biofilme oral, sendo a sua progressão e evolução influenciada por um variado leque de factores e determinantes. Podem ser distinguidos factores genéticos, ambientais, comportamentais, doenças sistémicas, predisposições dentárias, composição do biofilme oral entre outros factores de risco (15).

Existem tantos factores com influência na evolução e progressão da doença periodontal que se torna difícil estabelecer uma relação entre cada factor e o seu papel na doença periodontal (15; 16).

Como factores de risco e determinantes associadas à doença periodontal temos:

Tabela 1- Factores de risco associados à doença periodontal

Factor de risco	Referência
Genéticos	(17-23)
Idade	(24; 25)
Status socioeconómico	(26-28)
Tabaco	(29-33)
Microbiota	(1; 6; 8; 10; 34)

1.3.Aspectos microbiológicos da doença periodontal

Verifica-se assim que os factores microbiológicos assumem um papel importante como factores determinantes no aparecimento da doença periodontal e portanto poderão ser potenciais ferramentas de diagnóstico.

1.3.1.Composição e formação do biofilme subgingival

O biofilme oral ou placa dentária pode ser definido, como uma comunidade microbiana diversificada, que adere à superfície dos dentes, ou a qualquer outra superfície dura da cavidade oral, (como restaurações fixas ou removíveis). Esta comunidade encontra-se incorporada numa matriz extracelular de polímeros do hospedeiro e de origem microbiana (35; 36). Os microrganismos quando crescem em biofilme apresentam propriedades, que não exibem quando se multiplicam isoladamente, tais como resistência a antimicrobianos sistémicos ou locais e aumento da patogenicidade. A existência do biofilme oral é natural e contribui para o desenvolvimento das defesas do hospedeiro (3; 37).

Numerosos estudos relatam, que a microflora oral difere tanto no género como no número de espécies encontradas em doença ou em saúde periodontal (38). A formação do biofilme oral tem sido estudada, considerando variáveis como, idade, dieta, deficiências imunitárias do hospedeiro, etc. A sua composição varia também consoante

os diferentes locais anatómicos uma vez que a placa dentária acumula-se principalmente nos locais mais protegidos das forças mastigatórias e acção da língua (35; 39).

A formação do biofilme oral apresenta várias fases:

A primeira fase consiste na adsorção de moléculas provenientes do hospedeiro e bactérias, na superfície do dente, formando-se assim uma película imediatamente após a erupção ou higienização da peça dentária, esta funciona como superfície de sinalização/interacção com o microbiota, iniciando-se a colonização primária, a formação desta película influencia directamente o padrão de colonização inicial (40).

De seguida, inicia-se o transporte passivo de células bacterianas para a superfície dentária. Interações físico-químicas de longo alcance e intensidade fraca, entre a célula microbiana e a película que reveste a superfície dentária, dão origem a uma área onde poderá ocorrer a adesão reversível. De seguida, interações de curto alcance mas de intensidade forte, entre moléculas específicas presentes na superfície da célula bacteriana (adesinas) e os receptores complementares na película, resultam numa ligação irreversível. Os colonizadores primários não possuem um só tipo de adesina, podendo assim participar em diversas interações tanto entre as moléculas presentes na película como também com os receptores bacterianos de outras espécies (co-adesão) (35). A co-adesão dá-se com os chamados colonizadores tardios. Esta fase envolve interações específicas entre bactérias (adesina-receptor) que levam a um aumento da diversidade do biofilme (41).

Depois de aderidos ao biofilme, os microrganismos multiplicam-se através da divisão celular originando um crescimento e a uma organização funcional e espacial do biofilme. A produção de polímeros leva à formação de uma matriz extracelular complexa, constituída por glucanos, frutanos e heteropolímeros solúveis e insolúveis. A matriz é um componente característico das organizações em biofilme, esta pode ser biologicamente activa e reter nutrientes, água e enzimas chave para o desenvolvimento dos microrganismos do biofilme (42). Os substratos endógenos provenientes da saliva e fluido crevicular são a fonte principal de nutrientes para as bactérias.

Os colonizadores primários do biofilme oral são microrganismos gram-positivos facultativos que vivem num meio ambiente aeróbio para um ambiente cada vez mais privado de oxigénio onde começam a aparecer espécies gram-negativas anaeróbias. Um

dos principais microrganismos associado a esta colonização secundária é o *Fusobacterium nucleatum* cuja superfície contém os receptores para uma variedade de espécies microbianas consideradas tardias na colonização do biofilme oral como: *P. gingivalis*, *P. intermedia*, *P. endodontalis* e *P. nigrescens* (43). A visualização da formação do biofilme oral foi recentemente publicada por Zijnga e colaboradores (43) com recurso a marcadores moleculares fluorescentes confirmando muitos dos pressupostos teóricos na base da formação do biofilme oral supra e subgingival (43).

Habitando em biofilme os microrganismos podem responder a um sinal do meio ambiente e libertarem-se da superfície onde se encontram aderidos, podendo iniciar assim a colonização noutros locais (43; 44).

Uma vez estabelecido o biofilme oral, este permanece relativamente estável durante o tempo o que poderá ser benéfico para o hospedeiro, visto que a microflora residente desempenha um papel fundamental no normal desenvolvimento fisiológico do hospedeiro reduzindo assim as hipóteses de infecção actuando como uma barreira para a colonização de microrganismo exógenos (normalmente patogénicos) (45). Os mecanismos que contribuem para a colonização de resistência incluem uma competição mais efectiva por nutrientes e locais de ligação, produção de factores de inibição e a criação de condições de crescimento não favoráveis pela microflora residente. A terapêutica deve passar por controlar o biofilme e não tentar eliminá-lo (35).

1.3.2. Microflora associada à periodontite

A doença periodontal desenvolve-se em locais colonizados por diversas espécies de bactérias, tendo sido descritas 300 a 400 espécies colonizadoras da cavidade oral. Ao longo do tempo têm surgido hipóteses para explicar o papel desempenhado pelos microrganismos no aparecimento e desenvolvimento da doença periodontal (46).

A primeira teoria é apresentada por Loesche 1976 (47) a “ Hipótese específica da placa” que diz: apesar da grande diversidade microbiana presente na placa apenas um pequeno número de microrganismo é o responsável pela causa da doença (48). De acordo com esta teoria espécies específicas de bactérias são responsáveis por diferentes tipos de doença periodontal (46) Por exemplo a associação encontrada com a presença de espiroquetas na gengivite ulcerativa necrosante, a presença de *A.*

actinomycetemcomitans na periodontite agressiva e a presença de *P. gingivalis* na periodontite crónica (46).

Theilade 1986 (49) apresenta uma teoria diferente a “Hipótese não específica da placa” que sugere que a doença periodontal é o resultado das interações de todas as espécies bacterianas presentes na placa, reconhecendo que a placa é uma comunidade bacteriana (48). Contudo, na doença periodontal verifica-se que um determinado número de microrganismo é encontrado em número mais elevado nos locais com doença (48). Para explicar este facto Marshall 1994 (50) propõe a teoria da “Hipótese ecológica da placa” defendendo que a selecção das bactérias patogénicas está directamente ligada a mudanças no meio ambiente e que as doenças não necessitam de uma etiologia específica (48). Nesta teoria aceita-se que se um determinado local desenvolver as condições ecológicas favoráveis para o crescimento de determinadas espécies, estas vão produzir factores de virulência suficientes para vencer as defesas do hospedeiro durante um determinado período, em que se verificará destruição tecidual (46).

1.3.2.1. Complexos microbianos

Socransky e colaboradores em 1998, (51) avaliaram amostras de biofilme subgingival recolhidas de 185 indivíduos, através da técnica DNA-DNA checkboard obtiveram a identificação das espécies presentes nas amostras, recorrendo a ferramentas de análise de agrupamentos e ordenação de comunidades observaram a presença de 5 complexos microbianos. Entende-se por complexos microbianos, associações específicas entre espécies bacterianas presentes no biofilme subgingival (52).

Os 5 complexos microbianos descritos presentes em amostras de placa subgingival são:

- Complexo vermelho: *P. gingivalis*, *B. forsythus*, *T. denticola*.
- Complexo laranja: *F. nucleatum*, *P. intermedia*, *P. nigrescens*, *Peptostreptococcus micros*, *Campylobacter rectus*, *Campylobacter showae*, *Campylobacter gracilis*, *E. nodulum*, *S. constellatus*.

- Complexo verde: espécies de *Capnocytophaga*, *Campylobacter concisus*, *Eikenella corrodens*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
- Complexo amarelo: *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguis* e *Streptococcus oralis*.
- Complexo púrpura: *Actinomyces odontolyticus*, *Veillonella parvula* (51).

Existem associações entre os diferentes complexos patogénicos, por exemplo o complexo vermelho é sempre observado na presença de membros do complexo laranja contudo o complexo laranja é observado sem o complexo vermelho estar presente, o que poderá levar a concluir que o complexo vermelho só se forma depois do complexo laranja estar presente (51).

Em estudos em que se analisou a presença dos microrganismo isolados, conclui-se que na grande maioria estes só se encontram presentes dentro do seu complexo e não isoladamente (51). O complexo vermelho encontra-se relacionado com a existência de bolsas periodontais patológicas e a existência de sangramento à sondagem, parâmetros clínicos considerados essenciais para o diagnóstico da periodontite (53).

As espécies que constituem os diferentes complexos, foram localizadas por imunohistoquímica por alguns autores, (Kigure e colaboradores e Noiri e colaboradores) (54; 55) que verificaram que os microrganismos associados ao epitélio gengival pertencem ao complexo vermelho e os microrganismos associados à superfície do dente pertencem ao complexos amarelo, verde e púrpura.

1.3.3.2. Etiopatogenia

Apesar de, como já foi referido, a doença periodontal ser de etiologia multifactorial, a componente bacteriana está sempre presente e é considerada um factor iniciador (15; 16; 34; 56). Considera-se assim que esta é uma patologia complexa envolvendo a presença de microrganismos gram- negativos anaeróbios que estabelecem interacções com as células do hospedeiro numa situação de desequilíbrio que leva à perda de suporte periodontal (5).

Não obstante o papel importante dos microrganismos no estabelecimento da patologia considera-se que a componente bacteriana é insuficiente para que a doença se instale, e a presença de um hospedeiro susceptível, um ambiente favorável, aliada a um conjunto de bactérias patogénicas são factores fundamentais (57).

Os sinais clínicos da doença periodontal encontram-se presentes simultaneamente com o aumento da proporção dos membros do chamado complexo vermelho, (*Tannerella forsythia*, *Porphyromonas gingivalis*, e *Treponema denticola*) (58-60).

Os agentes patogénicos Gram- negativos mais reconhecidos e associados a esta patologia são: *Porphyromonas gingivalis*, *Prevotella intermedia*, *Bacteroides forsythus*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Capnocytophaga species*, *Campylobacter rectus* (57; 61).

Porphyromonas gingivalis

Anteriormente conhecida por *Bacteroides gingivalis*, é uma bactéria estritamente anaeróbia, gram- negativa em forma de bastonete. É um microrganismo de coloração escura que produz um pigmento negro. A *Porphyromonas gingivalis* é revestida por uma cápsula constituída por hidratos de carbono, que impede a opsonização pelo sistema complemento e inibe não só a fagocitose pelos neutrófilos como a quimiotaxia dos leucócitos. Este organismo possui vários factores de virulência (incluindo proteases que degradam imunoglobulina, complemento, fibras de colagénio, ácido hialurónico; adesinas, endotoxinas, e citotoxinas) que podem afectar directamente o periodonto ou desencadear respostas no hospedeiro que culminam em danos gengivais e ósseos típicos da Doença Periodontal. A *P.gingivalis* exprime três factores principais de virulência: fímbrias, gingipains e lipopolissacarídeos. Testes *in vitro* demonstram que a *P.gingivalis* é um dos microrganismos patogénicos periodontais que mais capacidade apresenta para aderir e invadir o epitélio oral (1; 62). É um dos microrganismos mais estudados relacionados com a doença periodontal (57; 63).

Na tabela 2, apresenta-se um quadro que mostra a prevalência da *Porphyromonas gingivalis*, em diferentes populações estudadas.

Tabela 2- Prevalência de *Porphyromonas gingivalis* encontrada em diferentes estudos.

Referência	Grupo de estudo	Método de colheita	Técnica utilizada	Porcentagem
Doungudomdacha (2001)	50 pacientes com periodontite	Curetas estéreis	PCR Quantitativo competitivo	93,9%
Fujise et al. (2002)	104 pacientes	Cones de papel	PCR	87%
Ito et al (2010)	26 pacientes	Cones de papel	PCR	50 %
Rans (2006)	98 pacientes	Cones de papel estéreis	Cultura	13 %
Sanz (2004)	92 pacientes	Cones de papel estéreis	Cultura e real time -PCR	84,4%
Sanzes (2008)	33 pacientes 20 P.a. * 13 P.c. †	Cones de papel estéreis	PCR	39 %
Sato (2004)	18 pacientes com periodontite 12 saudáveis	Sondas periodontais estéreis	Nested PCR	17 %
Takeuchi et al (2001)	123pacientes: 20 saudáveis, 38P.a,65 P.c.93p	Cones de papel	PCR	10% Saudáveis, 95.3% P.c. 84,2 % P.a.
Yuan et al. (2001)	246 pacientes	Curetas estéreis	PCR	46,7%

* P.a. – periodontite agressiva

† P.c. – periodontie crónica

Da tabela anterior conclui-se que *P.gingivalis* não está sempre presente na doença periodontal (13 % mínima e 93,9 % máxima) e que em situações de saúde também é possível encontrar *P.gingivalis*.

A prevalência de *P.gingivalis* na periodontite crónica varia entre 28 a 97%, sendo o microrganismo mais encontrado entre diferentes populações com periodontite crónica (64) Factor que levou a escolher a *Porphyromonas gingivalis* como microrganismos a identificar neste trabalho.

Prevotella intermedia

Prevotella intermedia, anteriormente denominada *Bacteroides intermedius*, é uma bactéria gram-negativa produtora de um pigmento negro. Esta espécie resiste à fagocitose, provavelmente em virtude da sua cápsula. A sua presença é associada á gengivite aguda necrosante, gengivite gravídica e periodontite crónica, tendo sido isolada em amostras provenientes de bolsas periodontais profundas. É um importante patogénico periodontal, em associação com a *Porphyromonas gingivalis* e com o *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (65).

Fusobacterium nucleatum

É uma bactéria Gram- negativa fusiforme, sendo considerada um importante patogénico periodontal, particularmente no início da Doença Periodontal de progressão rápida. É um componente chave da placa periodontal devido à sua abundância e sua capacidade de co-agregação com outras espécies na cavidade oral (65). Possui vários factores de virulência, como a cápsula, endotoxinas, ácido succínico, que inibe a fagocitose, entre outras enzimas. Encontra-se associado abscessos periodontais (46).

Tannerella forsythensis

Tannerella forsythensis - antigo *Bacteroides forsythus* - é um bastonete Gram-negativo não pigmentado sacarolítico anaeróbio. Possui vários factores de virulência, incluindo a produção de uma protease *trypsin-like* e lipopolissacarídeos e capacidade de penetração em células hospedeiras e indução da apoptose (65).

Capnocytophaga sp

Capnocytophaga são bacilos Gram-negativos. Existem três espécies distintas - *C. ochracea* (anteriormente *Bacteroides ochracea*), *C. sputigena* e *C. gingivalis*. A primeira está implicada no início da Periodontite agressiva localizada e Doença

Periodontal Crónica. Esta bactéria produz lipopolissacarídeos com actividade em osso alveolar, proteases extracelular que, por sua vez, podem lesar imunoglobulinas (57).

Peptostreptococcus micros

Peptostreptococcus micros é uma Bactéria Gram-positiva anaeróbia, que está associada com a Doença Periodontal, bem como várias outras infecções polimicrobianas noutras doenças sistémicas. A prevalência de *P. micros* na Periodontite avançada é de 58% a 63%, representando 12% a 15% da cultura viável. Em pacientes periodontais, a prevalência de *P. micros* foi maior nos indivíduos com doença activa, o que apoia que o *P. micros* desempenhe um papel na perda progressiva de *attachment* (65). Esta conclusão foi apoiada noutro estudo onde *Peptostreptococcus micros*, *Wolinella recta*, e *Fusobacterium nucleatum* foram as únicas espécies detectadas numa ou mais amostras de pacientes com doença activa. Esta espécie bacteriana foi igualmente associada (18% dos casos) com o insucesso do tratamento periodontal e fracasso de implantes. É então seguro afirmar que existe uma forte associação desta espécie bacteriana com a Doença Periodontal e peri-implantite (57; 65).

Espiroquetas

As espiroquetas são microrganismos móveis em forma de espiral com flagelo. Duas espécies importantes - *Treponema denticola* e *Treponema vincentii* - podem estar envolvidas na Doença Periodontal. Ambas produzem um lipopolissacarídeo, e produtos finais metabólicos invulgares, como o indol, hidrogénio sulfídrico e amónia, que são potencialmente tóxicos para as células do hospedeiro (57).

À semelhança de outros agentes patogénicos periodontais, as espiroquetas foram observadas numa proporção maior de pacientes com Doença Periodontal do em pacientes periodontalmente saudáveis (57).

O *T. denticola* é frequentemente isolado de locais gravemente afectados em pacientes com Doença Periodontal. Muitos estudos têm tentado elucidar o papel do *T. denticola* na etiologia da Periodontite. Foi demonstrado que esta bactéria se consegue ligar aos fibroblastos gengivais humanos, proteínas da membrana basal, bem como

outros substratos através de mecanismos de ligação específicos, ligação essa que resulta na citotoxicidade e morte celular devido a enzimas e outras proteínas (57).

Takeuchi e colaboradores (2001) verificaram que *Treponema socransky*, *T. denticola* e *P. gingivalis* eram frequentemente detectados em pacientes com Doença Periodontal através da técnica de PCR em amostras de placa e saliva. Estes descobriram que a presença de *T. socransky* foi associada com Periodontite, tendo sido detectada com maior frequência em locais onde foi observada uma grave destruição dos tecidos periodontais (57).

Aggregatibacter actinomycetemcomitans

Anteriormente conhecido por *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, este é um bacilo-coccoide Gram-negativo facultativo. A sua presença nas bolsas periodontais está associada a Periodontite Agressiva e Doença Periodontal Crónica. Vários factores de virulência são relatados: leucotoxina, factores imunossupressores, a inibição das funções PMNS, etc.(57; 66).

A Leucotoxina desta bactéria é o factor mais importante na medida em que consegue destruir leucócitos polimorfonucleares e monócitos do sangue periférico de humanos e primatas, atacando deste modo a resposta imune inata directamente. A endotoxina do *A.actinomycetemcomitans* apresenta o potencial de modular as respostas do hospedeiro e contribuir para a destruição tecidular. A capacidade do lipopolissacarídeo do *A.actinomycetemcomitans* para estimular macrófagos para libertar interleucina IL-1, IL-1 β , e factor de necrose tumoral (TNF) é de grande importância. Estas citocinas, entre outras actividades, são capazes de estimular reabsorção óssea (56).

Na tabela 3, apresenta-se um quadro que mostra a prevalência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, em diferentes populações estudadas.

Tabela 3- Prevalência de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* encontrada em diferentes estudos

Referência	Grupo de estudo	Método de colheita	Técnica utilizada	Porcentagem
Doungudomdacha(2001)	50 pacientes com periodontite	Curetas estéreis	PCR Quantitativo competitivo	91,8 %
Fujise et al. (2002)	104 pacientes	Cones de papel	PCR	40%
Ito e tal (2010)	26 pacientes	Cones de papel	PCR	42%
Rans (2006)	98 pacientes	Cones de papel estéreis	Cultura	31 %
Riggio et al (1996)	43 pacientes	Curetas estéreis	PCR e Cultura	40 %
Sanz (2004)	92 pacientes	Cones de papel estéreis	Cultura e real time -PCR	6,3 %
Sanzes (2008)	33 pacientes 20 periodontite agressiva, 13 periodontite crônica	Cones de papel estéreis	PCR	47%
Sato (2004)	18 pacientes com periodontite 12 saudáveis	Sondas periodontais estéreis	Nested PCR	17 %
Yuan et al. (2001)	246 pacientes com periodontite	Curetas estéreis	PCR	5,7%
Yuan et al. (2002)	328 indivíduos (7-12 anos)	Curetas estéreis	PCR	5,7%

Da tabela seguinte concluí-se que as percentagens em que o *A.actinomycetemcomitans* se encontra presente variam entre 5,7 % e 91,8%.

A presença deste microrganismo associado à periodontite agressiva varia entre 3% a 53% e a sua prevalência parece duplicar nos casos de periodontite agressiva (64). É microrganismo mais relatado em relação a esta patologia, e tem mostrado uma baixa capacidade de resposta à raspagem e alisamento radicular sendo muitas vezes necessário recorrer a antibioterapia, considera-se assim importante o estudo deste microrganismo (64).

1.3.3.3. Factores de virulência

A presença de bactérias periodonto-patogénicas é um factor essencial para a iniciação da doença periodontal. Sabe-se que algumas bactérias associadas à doença periodontal expressam factores de virulência únicos (67) que vão interferir com as respostas do hospedeiro (1; 68).

A virulência de cada agente microbiano é multifactorial, sendo influenciada pelo potencial patogénico inerente a cada bactéria (definido no seu genoma), pelo meio ambiente em que a bactéria se encontra (que determina a expressão dos factores de virulência) e mesmo pelas interacções entre o hospedeiro (que determinam o ambiente em que a bactéria se desenvolve) (1).

Os factores de virulência das espécies patogénicas permitem às bactérias:

- Causar dano tecidular, ao produzirem substâncias que activam a resposta do sistema imunitário do hospedeiro;
- Colonização da superfície do dente e sulco gengival (69).

A *Porphyromonas gingivalis* é um dos microrganismos que apresenta um número variado de factores de virulência tais como: *fimbriae* lectin-type, adesinas, a cápsula polissacarídea, lipopolissacarídeos, proteinases, produtos tóxicos provenientes do metabolismo, e enzimas (3). Factores de virulência como a *fimbriae* (FimA) e proteinase cisteínica (gingipains) contribuem para a invasão das células do epitélio oral (1; 70).

1.3.3.4. Equilíbrio hospedeiro-hóspede

As bactérias periodonto-patogénicas vão iniciar o desenvolvimento da doença periodontal, activando os mecanismos de defesa do hospedeiro, que levarão à destruição periodontal (67).

As células epiteliais do hospedeiro além de desempenharem um papel fundamental como barreira física contra a invasão bacteriana, apresentam também um papel fundamental ao iniciarem a resposta inflamatória. As interacções, decorrentes do

processo de colonização, entre microrganismos e hospedeiro levam à activação da cascata de sinalização, que regula a transcrição de genes responsáveis pelo sistema imune (69).

Durante o início da resposta inflamatória, são libertadas numerosas citocinas, como protoglandina E2 (PGE2), interleucina (IL)-1 β , IL-6, ou factor de necrose tumoral (TNF)- α , por células presentes no epitélio juncional e tecido conjuntivo, (fibroblastos, macrófagos, e PMNs). Em seguida, as células T e B segregam imunoglobulinas e antígenos específicos. Adicionalmente enzimas como as metalo-proteinases da matriz (MMP-8, MMP-9, MMP-13) são produzidas pelos PMN e por osteoclastos e levam à degradação do tecido conjuntivo e osso alveolar(69; 71; 72). A PGE2 actua como um potente vasodilatador aumentando a capilaridade e permeabilidade o que leva aos sinais clínicos de edema e eritema. PGE2 vai estimular os fibroblastos e osteoclastos na produção de MMPs. Por último, as MMPs afectam a remodelação e degradação do periodonto (1; 69; 73).

1.4.Métodos de diagnóstico microbiológico das doenças periodontais

1.4.1. Relevância prática do diagnóstico microbiológico

As doenças periodontais são infecções causadas primariamente por bactérias que habitam em biofilme. A identificação de bactérias específicas presentes em amostras de placa subgingival poderá contribuir para a determinação do risco de desenvolver doença periodontal, conhecer a composição do biofilme em saúde periodontal e ainda saber qual o comportamento da microflora pós terapia periodontal (74).

Estudos recentes mostram que existem espécies além dos agentes patogénicos conhecidos, que parecem estar associadas à periodontite (75). Alguns autores defendem que actualmente a investigação no campo do diagnóstico microbiológico não deve passar por identificar microrganismos patogénicos específicos, mas sim perceber como é que o microbioma actua no ecossistema dinâmico que é a cavidade oral (51). Entende-se por microbioma toda a comunidade ecológica, comensal, simbiótica e patogénica que ocupa e partilha todo o organismo humano (76; 77). Foi demonstrado recentemente que o microbioma oral é constituído por aproximadamente 19 000 filotipos (78). Alcançou-

se este número através da análise de amostras de saliva e placa provenientes de 98 adultos com saúde periodontal, verificou-se existir um núcleo de bactérias não associadas à doença periodontal semelhante nos indivíduos (59; 79; 80) .

Segundo Friedrich, os testes laboratoriais de diagnóstico só têm significado quando nos dão informação que ajudará directamente na escolha das medidas terapêuticas (81). A informação microbiológica, pode servir como guia na escolha de um antibiótico específico, em casos de periodontites em que se recorreu à antibioterapia e que não tenham respondido ao antibiótico previamente usado. Segundo a informação actual acerca da microbiologia da periodontite, existe um leque variado de microrganismos na placa subgengival por identificar, e os testes laboratoriais de diagnóstico poderão ser úteis para a sua identificação e associação com as diferentes formas de doença (82; 83).

1.4.2.Cultura microbiológica

Os métodos de diagnóstico por cultura são considerados clássicos, na identificação de espécies bacterianas presentes na placa subgengival. Este método de diagnóstico permite determinar qual a sensibilidade dos microrganismos periodontopatógenicos a antimicrobianos, identificar diferentes espécies na mesma amostra, conhecer a fisiologia e patogenia dos microrganismos (59; 84).

Contudo este método de diagnóstico apresenta algumas limitações, como a difícil recuperação de espécies cultiváveis, quando estas se encontram em baixo número, apresentarem baixa especificidade, necessita de microrganismos viáveis o que pressupõe condições de transporte específicas, a presença de espécies como *Treponema* e *Tannerella*, na placa subgengival que necessitam de condições de crescimento muito rigorosas sendo difíceis de detectar e quantificar quando esta técnica de diagnóstico é usada (85-87).

As limitações acima referidas, em conjunto com os requisitos rigorosos tais como: a necessidade de operadores experientes e familiarizados com esta técnica; o tempo e custo relativamente elevado; o transporte da amostra; a necessidade de diferentes meios de cultura, podendo ser selectivos ou não selectivos; a necessidade de nutrientes e factores de crescimento; e ainda poderem ocorrer inibições de crescimento entre diferentes espécies através da produção de bacteriocinas; levaram ao

desenvolvimento de outros métodos de diagnóstico, baseados principalmente no diagnóstico imunológico ou em ácidos nucleicos (88).

1.4.3.PCR , Real Time-PCR e hibridação checkerboard DNA-DNA

O emprego de técnicas de AAN (amplificação de ácidos nucleicos) na microbiologia clínica é útil para a caracterização e estudo das doenças infecciosas e as suas aplicações práticas banalizaram e transformaram-se em técnicas rotineiras presentes sob a forma de testes comerciais (89).

A reacção de PCR (*Polimerase chain reaction*) uma técnica AAN, aparece em 1983, e a sua aplicação prática é demonstrada por Saiki *et al*, em 1985 (90; 91). O uso desta técnica propagou-se rapidamente, a amplificação molecular tornou-se assim no pilar da investigação biomédica. A sequenciação e descoberta de genes, o estudo de polimorfismos genéticos, a caracterização e quantificação das transcriptases genéticas, dependem da existência em quantidade suficiente de ácidos nucleicos gerados *in vitro* através de AAN. Com o desenvolvimento destas técnicas moleculares a sua aplicabilidade foi sendo demonstrada e utilizada na identificação de microrganismos específicos presentes em amostras clínicas (89).

PCR

É a técnica mais usada actualmente, através desta reacção, uma simples cópia de ácidos nucleicos, é multiplicada 10^7 vezes num pequeno período de tempo. PCR é uma reacção enzimática, onde uma sequência específica de ADN é amplificada. Trata-se de um processo de amplificação exponencial, uma vez que o produto resultante de cada ciclo de amplificação é utilizado como molde no ciclo seguinte. É este processo de amplificação exponencial que confere a esta reacção a sua grande sensibilidade na identificação de sequências específicas de ácidos nucleicos (92; 93). O produto final amplificado é obtido após 25 a 50 ciclos de amplificação, cada ciclo compreende 3 passos:

1. Desnaturação do alvo
2. *Annealing* do *primer* no alvo
3. Extensão do alvo do *primer*

No final de cada ciclo, vamos ter o produto dobrado, o procedimento é realizado num termociclador programado para o número de ciclos necessários e as condições de tempo e temperatura de cada um dos passos (94).

Para que ocorra a reacção de PCR necessitamos de vários componentes. Em cada tubo de PCR onde decorrerá a reacção é colocada uma master mix composta por: molde (pode ser ADN purificado), *primer forward*, *primer reverse*, tampão de reacção, iões magnésio, DNTP mix e ADN polimerase. São os *primers forward* e *reverse* que vão determinar qual a sequência e comprimento do produto final amplificado. A concentração de iões Mg^{2+} afecta a actividade enzimática. A polimerase mais usada nestas reacções é a Taq DNA polimerase, uma enzima termo-estável, isolada de *Thermus aquaticus*, que permite que a reacção de amplificação seja realizada em temperaturas mais elevadas (91 a 94°C), melhora significativamente a especificidade, o rendimento, a sensibilidade, e comprimento de produtos que podem ser amplificados (92).

Resumidamente a técnica de PCR explora a capacidade de replicação do ADN em que uma única cadeia é utilizada como molde para síntese de novas cadeias.

Após a amplificação, os produtos resultantes são separados por tamanho através da electroforese num gel de agarose, submetido a uma coloração com um agente marcador do ADN. Os produtos são visualizados em bandas singulares fluorescentes correspondentes ao tamanho da sequência amplificada, numa câmara de luz ultravioleta (93).

A técnica de PCR convencional foi comparada com a técnica de cultura para detecção de *A. actinomycetemcomitans* de *P. gingivalis*, por Riggio e colaboradores (95), a reacção de PCR revelou uma frequência mais elevada na detecção destes microrganismos do que o método de cultura, ou seja mostrou ser mais sensível (95; 96). A eficácia desta técnica foi também testada por Mättö e colaboradores (97), na identificação da *P. gingivalis*, que concluíram que a técnica por PCR é mais sensível que a técnica clássica de cultura (97). A técnica de PCR convencional tem sido utilizada por vários autores na identificação de agentes periodonto-patogenicos como a *P.gingivalis*, o *A. Actinomycetemcomitans*, *P. intermedia* entre outros, em amostras de placa subgingival, revelando ser uma técnica viável, sensível e útil para o estudo de agentes microbianos associados à periodontite (98-102).

As técnicas de PCR apresentam vantagens sobre os métodos clássicos de cultura, pois têm mostrado ter alta especificidade, grande sensibilidade e os resultados são obtidos rapidamente, uma vez que podem ser lidos no mesmo dia em que a colheita da amostra é efectuada (94). No entanto, a detecção de um fragmento de um gene de um microrganismo não dá informação sobre a sua viabilidade, a sua organização celular ou a sua interacção com outros microrganismos, pelo que, os métodos clássicos continuarão a ser metodologias fundamentais.

A utilização da técnica de PCR convencional, fornece informação acerca da presença, ou ausência dos dados a avaliar, enquanto outras técnicas como hibridização *checkerboard* DNA-DNA ou o método de RT-PCR providenciam informação relativa à quantificação dos dados (96).

PCR- Quantitativo

Técnica desenvolvida com o objectivo de quantificar diversos agentes patogénicos, tipicamente utilizado para a determinação da concentração de ADN microbiológico presente nas amostras. A evidência científica sugere que as medidas de quantificação têm valor na determinação da relevância clínica de um resultado positivo qualitativo, na decisão da terapêutica, na predição, monitorização e capacidade de resposta do indivíduo à terapêutica. Os métodos utilizados para a determinação por quantificação de alvos nucleicos variaram ao longo dos anos incluindo várias técnicas como: PCR- competitivo, *Real time*- PCR (89).

***Real Time*- PCR**

É a técnica onde a amplificação e a identificação ocorrem no mesmo tubo. Um termociclador é combinado com um aparelho de fluorescência permitindo assim que se possa realizar a identificação e quantificação do produto do PCR à medida que vai ocorrendo a reacção (89).

A técnica de RT-PCR foi comparada com métodos de cultura por (Boutaga e colaboradores 2003, 2005, 2006, 2007, Lau e colaboradores 2004, Jervoe-Storm e colaboradores 2005), os resultados obtidos mostram que esta reacção é mais sensível na detecção dos microrganismos estudados (87; 103-107). Sakamoto e colaboradores (108), compararam a técnica de PCR convencional, RT-PCR, e os métodos clássicos de cultura na identificação e quantificação de *A. Actinomycetemcomitans*, *B. forsythus*, *P.*

gingivalis, *T. denticola* e *T. socranskii*, analisando amostras de saliva e placa subgengival, os resultados obtidos nas amostras de saliva analisadas pelas técnicas moleculares foram concordantes mostrando mais uma vez que a reacção de PCR é uma reacção bastante sensível. Através da técnica de RT-PCR a quantificação dos microrganismos foi conseguida em apenas uma hora utilizando o sistema *LightCycler*TM, os autores deste estudo concluíram também que os agentes microbianos periodonto-patogénicos são mais frequentemente detectados em amostras de saliva do que em amostras de placa subgengival (108). Lyons e colaboradores (109) demonstraram que esta técnica pode ser empregue no diagnóstico de microrganismos associados com a doença periodontal, analisando amostras de placa subgengival obtendo a quantificação de *P. gingivalis* presente sem ter de recorrer a métodos de cultura (104).

A técnica de RT-PCR tem demonstrado ser sensível como a técnica de PCR convencional, apresentando como vantagem face a esta, o facto de se obter a quantificação de bactérias presentes nas amostras, sem ser necessário recorrer a métodos de cultura. A quantificação é rápida obtendo-se resultados fidedignos (93).

Hibridação checkerboard DNA-DNA

Técnica desenvolvida por Socransky e colaboradores (1994), para a identificação e quantificação de 40 espécies de bactérias encontradas frequentemente na cavidade oral. Este método tem demonstrado ser altamente específico. Esta técnica tem sido utilizada em estudos ecológicos e epidemiológicos uma vez que não necessita de microrganismos viáveis e permite a análise de várias amostras e diversos agentes bacterianos (94). Consiste numa reacção de hibridação, onde sequências de oligonucleótidos (sondas de ADN de 24-30bases) ligam-se por complementaridade de bases, ao ADN bacteriano presente na amostra (2).

Anne D Haffajee e colaboradores (96), compararam a reacção de PCR utilizando (micro-IDent test) e hibridização checkerboard DNA–DNA, para a identificação de 13 espécies bacterianas em amostras de placa subgengival. Obtendo resultados similares com ambas as técnicas. A vantagem do uso desta técnica é a possibilidade de análise de várias espécies bacterianas simultaneamente.

Actualmente existem testes disponíveis no mercado para identificação microbiana a tabela seguinte resume alguns dos testes. Todos os testes representados na tabela recorrem a técnicas de hibridação.

Tabela 4- Testes de hibridização disponíveis no mercado, adaptado de (110)

Teste	DNA/RNA	Microrganismos detectados
DMDx Patho TeK®	DNA	<i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> Adicionais: <i>C. rectus</i> , <i>T. denticola</i> , <i>F. nucleatum</i> , <i>E. corrodens</i>
IAI Pado Test 4.5®	RNA	<i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>T. denticola</i>
MicroDent test®	DNA	<i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>T. denticola</i>
Perio Bac test®	DNA	<i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>T. denticola</i>

II. Objectivos

O objectivo deste trabalho foi verificar a exequibilidade da realização de um exame de diagnóstico adicional nos laboratórios da UCP. Esse exame consiste na análise microbiológica da presença de dois agentes microbianos associados à periodontite. O teste da exequibilidade da realização do exame consistiu na avaliação de:

- Procedimentos de colheita da amostra
- Procedimentos de extracção inicial de ADN
- Procedimentos de reacção de PCR para optimização dos resultados
- Avaliação da satisfação dos requisitantes das análises relativamente aos procedimentos de recolha.

III. Materiais e métodos

Reagentes e soluções:

- Solução salina esterilizada;
- TRIS (pH8);
- EDTA;
- Tween 0,5%;
- TAE;
- Agarose;
- Brometo de etídeo;
- Proteinase K;
- DyNAzyme TMIIDNA polimerase;
- dNTP Mix (Finnzymes);
- Controlo positivo adquirido de um banco de culturas (DSMZ) para as estirpes DSM 11123 *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* DSM 20709 *Porphyromonas gingivalis*.

Equipamentos:

- Micropipetas;
- Tina de electroforese Bio-Rad (Power pac 300) ;
- Termociclador (modelo PTC-150, MinicyclerTM da MJ Research);
- Transiluminador UV Vilber Lourmat;
- Centrífuga Hettrich Zentrifuger (Mikro 22R);
- Arca frigorífica -20° C Brandt;
- Arca frigorífica -70 °C;
- Banho-maria Stuart Scientific (Bibby);
- Bloco de aquecimento Stuart Scientific (Bibby);
- Vortex Velp Scientific;
- Incubadora com plataforma de agitação infors HT;
- Balança analítica Scaltec.

Amostra

As amostras foram colhidas de pacientes que recorreram à consulta de Periodontologia da Clínica Dentária Universitária da UCP entre Novembro e Junho de 2011, e cuja avaliação microbiológica foi requerida pela área de Periodontologia sem especificação da razão para a mesma. Foram colhidas em pacientes, cujo diagnóstico clínico fosse periodontite (em qualquer das suas classificações) evidenciada pela presença de bolsas patológicas (bolsas superiores a 4 mm). No total foram analisadas 59 amostras provenientes de 20 pacientes diferentes, foram recolhidas amostras em pelo menos dois dentes diferentes de cada paciente. As amostras foram colhidas por 17 operadores diferentes.

Colheita das amostras

Elaborou-se uma folha de registo dos pedidos (anexo II) onde os alunos/médicos dentistas preenchem a informação necessária ao processamento da amostra. Na primeira parte constam a identificação do doente/ processo clínico do qual a amostra procede, o diagnóstico à data da colheita e a identificação do médico/binómio que solicita a análise. Na segunda parte, podem ser seleccionados os microrganismos a detectar sendo as hipóteses: *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*. Numa terceira parte o operador identifica a amostra, dando assim informação acerca do dente, localização da bolsa e profundidade de sondagem, de onde a amostra procede.

Protocolo de colheita

O protocolo de colheita foi estandardizado e modificado de Komiya Ito e colaboradores. 2010(53) e fornecido aos alunos, que fizeram a recolha (anexo III). De forma sucinta, a placa bacteriana foi removida da superfície do dente, e foi utilizada uma sonda ou pinça estéreis para abrir a bolsa periodontal onde foram inseridas duas pontas de papel estéril até sentir alguma resistência, durante 10/30 segundos. As pontas de papel foram retiradas da bolsa com o cuidado de não haver toques em nenhuma outra superfície da cavidade oral e inseridas num tubo de 1,5 ml com solução salina esterilizada.

Depois de feita a recolha e identificadas as amostras, estas foram congeladas a -80°C. A recolha das amostras só foi realizada depois de assinado um consentimento informado pelos pacientes (anexo I).

Protocolo de extracção de ADN utilizado

O protocolo de extracção de ADN utilizado foi também modificado de Komiya Ito e colaboradores 2010 (53) (anexo IV). Brevemente, a amostra colhida foi agitada num vórtex durante um minuto para libertar as bactérias aderentes às pontas de papel e desta solução foram recolhidos 0,5 ml de amostra que foram centrifugados para a obtenção de uma *pellet* que foi posteriormente ressuspensa em 100µL de TRIS (pH8), 100µL de EDTA e 100µL de 0,5% Tween. Foram ainda adicionados 3 µL de solução de proteinase K. Esta solução foi aquecida a 55°C por 2 horas e posteriormente fervida a 95°C durante 5 minutos. As amostras assim obtidas foram congeladas para posterior utilização com ADN molde nas reacções de PCR.

Este protocolo de extracção foi testado (25/11/2010) em amostras recolhidas durante a consulta de Periodontologia em anos anteriores que estavam congeladas em arquivo. Os resultados da aplicação deste protocolo de extracção foram visualizados num gel de agarose (anexo V protocolo C), confirmando-se a presença de ADN e portanto a viabilidade da utilização deste método para o processamento das amostras.

Protocolo de amplificação de ADN em reacção de PCR

A selecção dos microrganismos a detectar com estes testes foi suportada pela bibliografia e argumentos incluídos na secção 1.3.2 da introdução. As duas espécies seleccionadas pela sua prevalência foram *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*. Os *primers* utilizados para a amplificação do ADN das amostras recolhidas dos vários dentes foram os previamente usados por Ito e colaboradores(53) que verificaram a sua especificidade e capacidade de detecção destes microrganismos em amostras de biofilme oral. As reacções de PCR foram realizadas utilizando a **DyNAzyme™ II como DNA** polimerase e nucleótidos dNTPMix (Finnzymes). Estes reagentes foram usados de acordo com as instruções do fabricante e nas concentrações adaptadas e descritas no protocolo em Anexo VI. Cada uma destas reacções foi preparada em microtubos com o ADN de cada uma das amostras e foi ainda elaborado um controlo positivo para cada um dos pares de *primers*

(*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e *Porphyromonas gingivalis*). O ADN que constituiu o controlo positivo foi adquirido a um banco de culturas (DSMZ) para as estirpes DSM 11123-*Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e DSM 20709 - *Porphyromonas gingivalis*.

As reacções de PCR foram realizadas num termociclador, de modelo PTC-150, MinicyclerTM, da MJ Research, sendo as condições de amplificação definidas em função da sequência dos *primers* utilizados e dos fragmentos que se pretendiam amplificar. As condições de amplificação para cada um dos *primers* constam do anexo V (protocolos A e B). Os resultados das reacções de amplificação por PCR foram visualizados num transiluminador com fonte de UV em géis de agarose elaborados com o protocolo C (anexo V).

Comunicação dos resultados e inquéritos de satisfação

Para avaliar a aplicabilidade dos protocolos propostos, a facilidade no processo de recolha das amostras e a importância que a comunidade académica da Clínica Dentária Universitária da UCP atribui a este dado microbiológico, elaborou-se um questionário de satisfação (anexo VI), que cada operador preencheu.

Este questionário visou avaliar dois parâmetros considerados fundamentais sendo estes: a Metodologia empregue na colheita e a utilidade para a consulta de Periodontologia. Para avaliar a metodologia utilizada foi pedido ao inquirido que responde-se a duas questões, uma delas sobre a sua satisfação com a folha de requisição e outra referente ao processo de recolha. A utilidade para a consulta de Periodontologia, foi também avaliada através de duas questões quanto à sua utilidade para o diagnóstico e utilidade para a elaboração do plano de tratamento.

As respostas consistiam em avaliar estes parâmetro numa escala de 1 a 4 em que, 1- Muito Insatisfeito; 2- Insatisfeito; 3- Satisfeito; 4- Muito Satisfeito.

O questionário proporcionava ainda a oportunidade de registar sugestões acerca das 4 questões.

Foram distribuídos 17 questionários, sendo estes preenchidos por todos os operadores que tiveram acesso a este protocolo. Os dados obtidos foram analisados através de gráficos obtidos no *software* Excel[®].

IV. Resultados e Discussão

A calendarização dos trabalhos laboratoriais realizados ficou registada e encontra-se resumida no anexo VIII. Este registo tornou-se essencial para o esclarecimento de algumas dúvidas que foram surgindo nos resultados e deve fazer sempre parte de um bom trabalho laboratorial principalmente quando está envolvida a resposta a uma questão clínica.

Os resultados das amplificações das várias amostras com *primers* específicos para *Porphyromonas gingivalis* foram sempre negativos em todas as amostras colhidas.

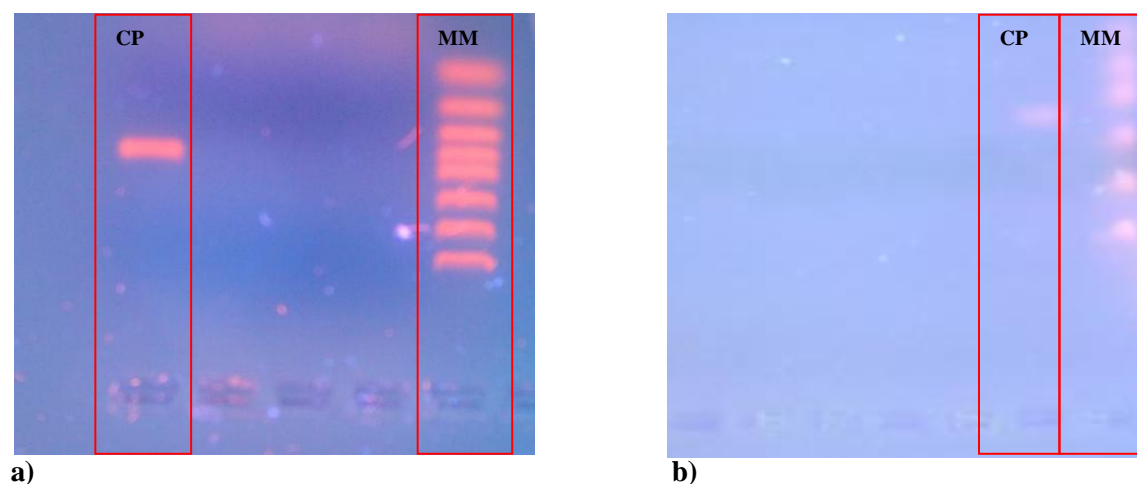


Figura nº 1 – Gel de electroforese relativo à análise de *Porphyromonas gingivalis* com MM- Marcador de peso molecular; CP- Controlo positivo a) Amostras 1 a 3 de placa subgengival e b) Amostras 4 a 8 de placa subgengival.

Na figura 1 são apresentados dois géis típicos da análise para *P.gingivalis* com o resultado das amostras (1 a 8) sendo que todas as amostras revelaram o mesmo tipo de resultado. A primeira dúvida que nos surgiu foi se as reacções de PCR teriam falhado, uma vez que seria de esperar alguns resultados positivos de acordo com o suporte bibliográfico. Como podemos verificar, consultando a tabela 2 incluída na secção 1.3.3.2 da revisão bibliográfica, a prevalência de *P. gingivalis* encontrada nos diferentes estudos apresentados varia desde 93,9% a 17%, sendo muito variável de estudo para estudo. Pusemos a hipótese da reacção de amplificação ter falhado, uma vez que estas

reações podem não ter resultados devido a: inadequação das concentrações dos reagentes, falhas nalgum dos reagentes, falhas nas condições de amplificação, ou falhas na especificidade dos reagentes. No entanto como está visível na Figura 4 a reacção funcionou quando foi adicionado como ADN molde uma diluição de 1:10 de um stock de amplificado de uma cultura de colecção (*Porphyromonas gingivalis*, DSM 20709) comprada para o efeito. Desta forma é garantido que quer os reagentes, quer as condições em que foi realizada a amplificação foram as correctas. Foi então necessário encontrar explicações alternativas para o facto de todas as amostras terem sido negativas para *Porphyromonas gingivalis*. Explicações que serão abordadas mais à frente ainda nesta secção.

O resultado das reacções de amplificação para as várias amostras com *primers* específicos para *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, foram também negativos para todas as amostras analisadas. Apesar de, como foi referido na tabela 3 incluída na secção 1.3.3.2 da revisão bibliográfica, a prevalência de *A. actinomycetemcomitans* encontrada nos diferentes estudos apresentados é por vezes muito baixa rondando os 6%, esperavam-se resultados positivos para as amostras 24,26-27, 47-48 e 50-54, uma vez que o diagnóstico indicado era de periodontite agressiva (anexo VI) e a presença deste microrganismo em associação com esta condição é muitas vezes referida na literatura (57; 66). Neste caso, além das razões técnicas que podem ser invocadas para a justificação dos resultados negativos para a presença de *Porphyromonas gingivalis*, há ainda a considerar que o diagnóstico de periodontite agressiva não tenha sido o correcto já que 3 a 53% dos casos de periodontite agressiva os autores (64; 112; 113) referem a detecção de *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.

Como os resultados para a identificação dos dois microrganismos propostos foram negativos em todas as amostras ao contrário do que seria espectável pôs-se a hipótese do ADN presente nas amostras estar muito diluído, por terem ocorrido erros durante o processamento das amostras e principalmente durante o isolamento.

Decidiu-se então fazer novo isolamento de ADN do volume excedente de amostra por processar, que encontrava-se conservado a -70 C, alterando os volumes de solução utilizados para -10 vezes, obtendo-se assim, maior concentração de ADN por amostra. Procedeu-se a nova amplificação com *primer* específico para *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Os resultados obtidos foram novamente negativos. Testou-se a mesma reacção com outras amostras colhidas em

2009 por alunos de anos anteriores e amostras frescas de biofilme oral, utilizando o protocolo de isolamento com um volume inicial de 0,5ml. A reacção de amplificação usando estas amostras e *primers* para *Porphyromonas gingivalis*. Os resultados foram negativos verificando-se no entanto a presença de ADN. Com o objectivo de verificar se o ADN visualizado seria bacteriano (podendo haver DNA bacteriano mas não de *P.gingivalis*), fez-se nova amplificação utilizando desta vez *primer* BOX (um *primer* universal que em teoria amplificaria várias zonas do DNA de qualquer espécie bacteriana). Os resultados desta análise Box com as amostras de biofilme foram negativos.

Com os resultados apresentados até esta fase fica-mos com a dúvida se o ADN que era visível nas amostras seria humano e não bacteriano? Para tentar recolher amostras com maiores quantidades de ADN procedeu-se à colheita de novas amostras, em conformidade com protocolo de colheita em anexo II, alterando o veículo de recolha, em vez de utilizar cones de papel, utilizaram-se cones de guta-percha e diminuindo o volume de solução salina nos tubos onde as amostras seriam colocadas. Os resultados da amplificação com *primer* específico para *Porphyromonas gingivalis* das novas amostras foram negativos, visualizando-se a presença do controlo positivo, como podemos ver na Figura 2.

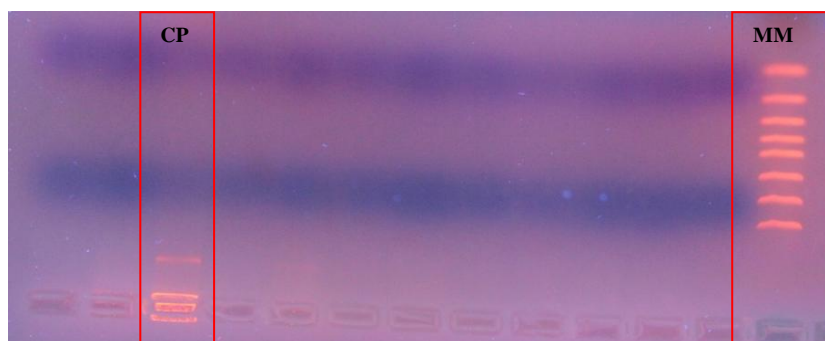


Figura nº 2- Gel de electroforese relativo à análise *P. gingivalis*. Amostras 55 – 61 de placa subgingival sem amplificação mas com ADN visível em 56, 57 e 59. MM- Marcador de peso molecular; CP- Controlo positivo.

Significando que a reacção de PCR foi realizada com sucesso. Testando a hipótese dos *primers* universais não estarem a amplificar as zonas pretendidas, realizou-se um novo teste utilizando culturas puras de *Lactobacillus* e *E.coli*, sujeitando-se assim estas amostras que sabíamos que continham material genético bacteriano à reacção de

amplificação com os *primers* universais, visualizando-se ADN apenas nas amostras referentes a *E. coli*, significando assim que os *primers* universais utilizados estão a funcionar, mas que não amplificam todas as espécies neste caso o *Lactobacillus*. Como podemos observar na Figura 3.

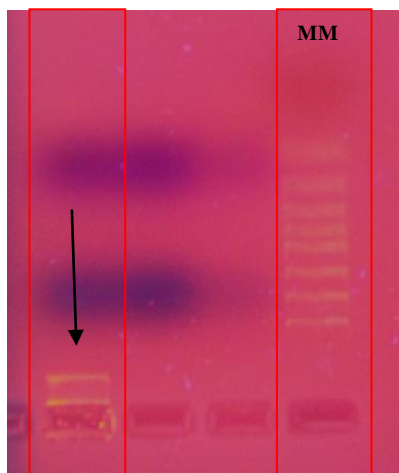


Figura nº 3 – Gel de electroforese relativo à amplificação com *primer* Box 1. Amostras de culturas puras de *E. coli* e *Lactobacillus* Amarela e Branca. Visível amplificação de *E. coli*. MM- Marcador de peso molecular.

A última questão que se coloca neste trabalho é: Serão os resultados obtidos verdadeiros negativos?

Assumindo que os passos laboratoriais foram os correctos pois as reacções de PCR foram bem sucedidas: verificou-se a presença do controlo positivo; os *primers* universais utilizados para confirmação de resultados também revelaram estar em plenas condições, o processo de isolamento de ADN foi confirmado através do carregamento de um gel de agarose visualizando-se a presença de ADN proveniente das amostras. Colocamos assim a hipótese de ter ocorrido uma falha deste protocolo no processo referente à colheita uma vez que a mesma foi realizada por uma grande diversidade de operadores, que poderão ter cometido “erros”: no tempo de colocação dos cones de papel na bolsa gengival, remoção inadequada da placa supragengival, entre outros. Erros que também podem ter sido induzidos pelo protocolo de colheita fornecido, discutido numa fase seguinte ainda nesta secção.

As prevalências de *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* encontradas pelos diferentes autores diferem muito consoante a população alvo, as amostras colhidas podiam estar no intervalo onde não se verifica a presença destes microrganismos

associados com a periodontite. É também necessário realçar que a amostra utilizada neste estudo foi reduzida e não permitiu obter resultados significativos. Não existe qualquer estudo publicado que relate a presença ou ausência *A. actinomycetemcomitans* e *P. gingivalis* na população portuguesa, factor que pode também adquirir significado.

Os critérios de inclusão utilizados neste estudo não foram muito abrangentes uma vez que não foram controlados hábitos individuais e sistémicos dos pacientes, um importante factor a considerar é a realização de antibioterapia antes da recolha da amostra, factores que não foram considerados como critério de exclusão.

Análise Questionários

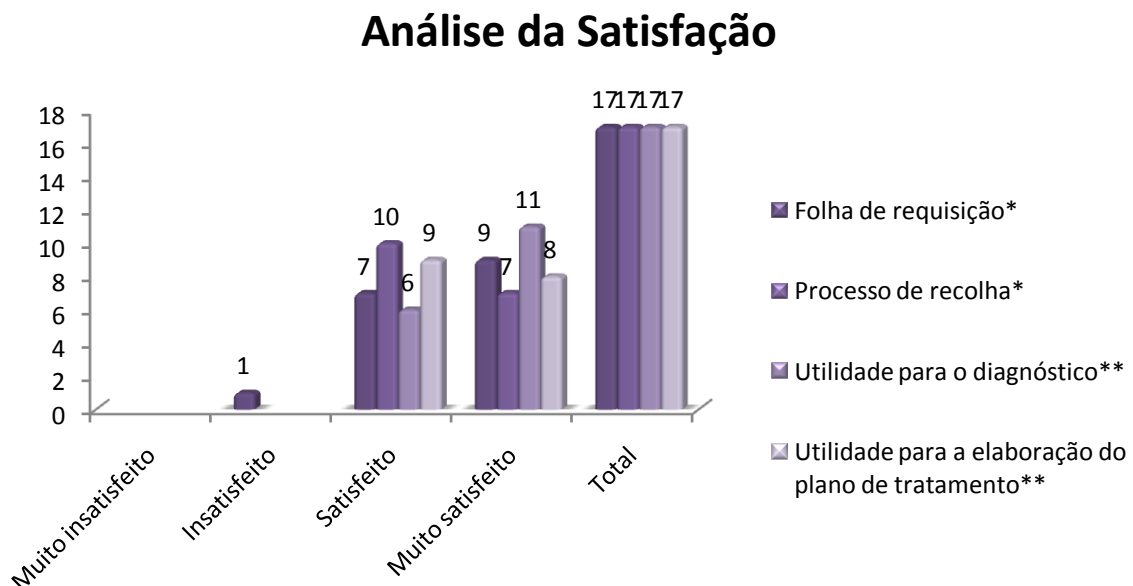


Figura nº4- Análise global dos questionários

O gráfico anterior, representado na Figura 4 sumaria os resultados dos inquéritos preenchidos aquando da divulgação do resultado dos testes.

Analisando os resultados para cada uma das questões individualmente observa-se que no que se refere à folha de requisição dos testes na Figura 5. Existe uma percentagem de 6% de insatisfação com a folha de requisição, 41 % dos operadores encontram-se satisfeitos e 53% muito satisfeitos. Dados estes que nos levam a considerar realizar modificações nesta mesma folha no âmbito de forma a torná-la mais

explícita, uma vez que também foram analisados alguns comentários que nos transmitiram a ideia que a folha não estaria a mais objectiva possível.

As modificações propostas são ao nível da terminologia utilizada, no campo de preenchimento respectivo à bolsa periodontal modificar para localização da bolsa periodontal.

Folha de Requisição

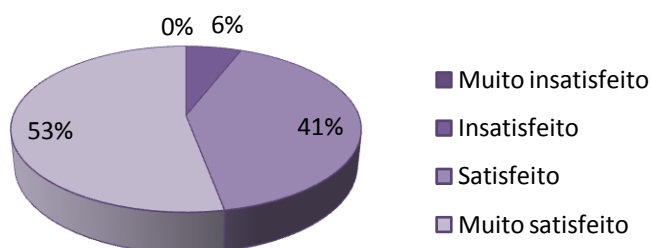


Figura nº5- Análise do campo referente à folha de requisição

Processo de Recolha

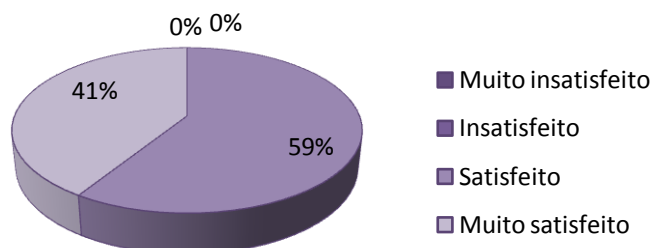


Figura nº6- Análise do campo referente à folha de recolha

Como podemos visualizar na Figura 6, referente ao processo de recolha adoptado, encontramos uma percentagem de 59% dos operadores satisfeitos e 41%, muito satisfeitos, o que nos leva a concluir que teremos de procurar a possibilidade de alterar a forma como as amostras periodontais foram colhidas, tornando este procedimento mais simples e célere.

Neste aspecto será possível melhorar a apresentação do protocolo de colheita, começando por alterar a forma como se encontra descrito deixando a informação mais sucinta e objectiva. Os resultados mostram que a forma como o material de recolha foi fornecido aos operadores, também deverá sofrer modificações, sendo assim as alterações propostas são: a entrega de tubos já identificados, onde seja apenas necessário escrever o código do processo clínico e respeitar a ordem das amostras, esta identificação prévia dos tubos tornará o processo de acondicionamento mais rápido e prático para os operadores e a obtenção de uma identificação correcta, a entrega de cones de papel ou guta-percha em mangas estéreis individualizadas, diminuí a possibilidade de contaminação das amostras, fornecendo também uma manga estéril contendo bolinhas de algodão. Os resultados laboratoriais parecem mostrar no entanto que a recolha com cones de guta-percha pode facilitar a primeira fase de ressuspensão do biofilme no laboratório uma vez que os cones de papel muitas vezes se desfazem e poderão ser responsáveis pela “sujidade” que verifica nalguns dos poços de electroforese.

Segundo a bibliografia actual não é espectável que o Médico Dentista espere pelo resultado da análise para fazer o diagnóstico. Sendo que este deve ser utilizado apenas como auxiliar na determinação do risco de desenvolver doença periodontal, saber qual o comportamento da microflora após a terapia periodontal (74) e servir como guia na escolha de um antibiótico específico, em casos de periodontites que não respondam à terapia inicial ou ao antibiótico previamente usado (82). O Médico Dentista deverá ter acesso ao resultado laboratorial na consulta seguinte.

Como o protocolo em questão apenas foi aplicado para a identificação de *Porphyromonas gingivalis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, os operadores que solicitaram esta análise apenas poderão ter a confirmação da presença ou ausência, destes microrganismos.

Para optimização deste protocolo e obtenção de resultados fidedignos em futuras investigações nesta área na UCP, propõe-se o estabelecimento de critérios de exclusão rigorosos na escolha da amostra, a realização da colheita da mesma pelo mesmo operador para que não exista possibilidade de enviesamento dos resultados, a utilização de cones de guta-percha durante a colheita e a obtenção de mais de um cone do mesmo

local da amostra para que exista maior concentração de amostra obtida no mesmo volume de solução salina.

V. Conclusões

Os resultados obtidos neste trabalho foram inconclusivos uma vez que não foi possível afirmar com certeza que as amostras analisadas estariam realmente negativas.

Foram criadas algumas das condições base necessárias para o estabelecimento do protocolo de diagnóstico de agentes microbianos associados à periodontite, proposto nesta tese. Condições que passaram pela elaboração e experimentação de vários protocolos.

O protocolo de colheita das amostras periodontais, proposto inicialmente elaborado e adaptado segundo o suporte bibliográfico, foi modificado após a análise dos resultados e terá de ser testado novamente recorrendo à colheita de novas amostras. Dadas as dificuldades técnicas registadas nos resultados sugere-se que, numa nova abordagem deste tema, as amostras seja colhidas pelo mesmo operador para minimizar os efeitos de eventuais erros.

O conjunto do resultado da avaliação do grau de satisfação dos operadores que participaram no processo de recolha (que engloba a avaliação da folha de requisição e protocolo de colheita fornecidos), e o registo das sugestões dos operadores que os utilizaram, possibilitou o melhoramento da folha de requisição tornando-a mais objectiva.

Segundo a bibliografia actual, a utilização deste método auxiliar de diagnóstico na prática clínica rotineira, revela não ter interesse para a obtenção de um diagnóstico diferencial. No entanto em âmbito académico demonstra ser importante, a sua implementação, para que futuros estudos, que venham a ser desenvolvidos na UCP, possam dispor desta ferramenta e não necessitem de recorrer a laboratórios exteriores para obtenção de resultados.

Conclui-se que será necessário melhorar o processo de recolha e processamento proposto inicialmente e testar experimentalmente a sua exequibilidade.

VI. Bibliografia

1. Andrian E, Grenier D, Rouabhia M. Porphyromonas gingivalis-epithelial cell interactions in periodontitis. Journal of dental research. 2006 May ;85(5):392-403.
2. Klaus H.Rateitschak. Herbert F. Wolf. Color Atlas of Dental Medicine Periodontology. 3rd ed. Thieme; 2005.
3. Graves DT, Jiang Y, Genco C. Periodontal disease: bacterial virulence factors, host response and impact on systemic health. Current opinion in infectious diseases. 2000 Jun ;13(3):227-232.
4. Williams R. Periodontal disease. New Engl. J. Med. 1990 ;322:373-382.
5. Lindhle J, Thorkild K, Nikkaus L. Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral. 4th ed. Rio de Janeiro: 2005.
6. Doungudomdacha S, Rawlinson A, Douglas CW. Enumeration of Porphyromonas gingivalis, Prevotella intermedia and Actinobacillus actinomycetemcomitans in subgingival plaque samples by a quantitative-competitive PCR method. Journal of medical microbiology. 2000 Oct ;49(10):861-74.
7. Armitage GC. Periodontal diseases: diagnosis. Annals of Periodontology / the American Academy of Periodontology. 1996 ;1(1):37-215.
8. American Academy Of Periodontology. Position Paper Epidemiology of Periodontal Diseases. J Periodontol 2005. 2005 ;76(8):1406-1419.
9. Paster B, Boches S, Galvin J. Bacterial diversity in human subgingival plaque. J Bacteriol. 2001 ;183:3770-3783.
10. Colombo APV, Boches SK, Cotton SL, Goodson JM, Kent R, Haffajee AD, et al. Comparisons of subgingival microbial profiles of refractory periodontitis, severe periodontitis, and periodontal health using the human oral microbe identification microarray. Journal of periodontology. 2009 Sep ;80(9):1421-32.
11. Moore W, Moore L. Moore WEC, Moore LH. The bacteria of periodontal diseases. Periodontol 2000. 1994 ;5:66-77.
12. Kumar P, Griffen A, Barton J, Paster B, Moeschberger M, Leys E. New bacterial species associated with chronic periodontitis. J Dent Res. 2003 ;82:338-344.
13. Santos NBMD. Protocolos de diagnóstico de doença Periodontal baseados na evidência científica. 2010 ;17-24.
14. Armitage GC. Classifying periodontal diseases – a long-standing. Periodontology 2000. 2002 ;30:9-23.

15. Nunn ME. Understanding the etiology of periodontitis: an overview of periodontal risk factors. *Periodontology* 2000. 2003 Jun ;32(1):11-23.
16. Kinane D. Periodontitis modified by systemic factors. *Ann Periodontol*. 1999 ;454-63.
17. Kornman K, Crane A, Wang H. The interleukin-1 genotype as a severity factor in adult periodontal disease. *J Clin Periodontol*. 1997 ;2472-77.
18. McDevitt M, Wang H, Knobelmann C. Interleukin-1 genetic association with periodontitis in clinical practice. *J Periodontol*. 2000 ;71156-163.
19. Diehl S, Wang Y, Brooks C. Linkage disequilibrium of interleukin-1 genetic polymorphisms with early-onset periodontitis. *J Periodontol*. 1999 ;70418-430.
20. Mark L, Haffajee A, Socransky S. Effect of the interleukin-1 genotype on monocyte IL-1beta expression in subjects with adult periodontitis. *J Periodontal Res*. 2000 ;35172-177.
21. Cullinan M, Westerman B, Hamlet S. A longitudinal study of interleukin-1 gene polymorphisms and periodontal disease in a general adult population. *J Clin Periodontol*. 2001 ;(28):1137-1144.
22. Thomson W, Edwards S, Dobson-Le D. IL-1 genotype and adult periodontitis among young New Zealanders. *J Dent Res*. 2001 ;801700-1703.
23. Kinane D, Hodge P, Eskdale J, Ellis R, Gallagher G. Analysis of genetic polymorphisms at the interleukin-10 and tumour necrosis factor loci in early-onset periodontitis. *J Periodontal Res*. 1999 ;34379-386.
24. Fox C, Jette A, McGuire S, Feldman H, Douglass C. Periodontal disease among New England elders. *J Periodontol*. 1994 ;65676-684.
25. Douglass C, Jette A, Fox C. Oral health status of the elderly in New England. *J Gerodontology*. 1993 ;4839-46.
26. Marmot M, Wilkinson R. *Social Determinants of Health*. 1999 ;291.
27. Astrom A, Rise J. Socio-economic differences in patterns of health and oral health behaviour in 25-year-old Norwegians. *Clin Oral Investig* . 2001 ;5122-128.
28. Schou L, Wight C. Does dental health education affect inequalities in dental health? *Community Dental Health*. 1994 ;1197-100.
29. Gross IS, Genco R, Machtei E. Assessment of risk for periodontal disease. II. Risk indicators for alveolar bone loss. *J Periodontol*. 1995 ;6623-29.
30. Grossi S, Zambon J, Ho A. Assessment of risk for periodontal disease. I. Risk indicators for attachment loss. *J Periodontol*. 1994 ;65260-267.

31. Amarasena N, Ekanayaka A, Herath L, Miyazaki H. Tobacco use and oral hygiene as risk indicators for periodontitis. *Community Dent Oral Epidemiol.* 2002 ;30:115-123.
32. Johnson G, Slach N. Impact of tobacco use on periodontal status. *J Dent Educ.* 2001 ;65:313-321.
33. Kinane D, Radvar M. The effect of smoking on mechanical and antimicrobial periodontal therapy. *J Periodontol.* 1997 ;68:467-472.
34. Boutaga K, Savelkoul PHM, Winkel EG, Winkelhoff AJ van. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymerase chain reaction. *Journal of periodontology.* 2007 Jan ;78(1):79-86.
35. Marsh PD. Dental Plaque as a Microbial Biofilm. *Caries Research.* 2004 ;204-211.
36. Allison D, Gilbert P, Lappin-Scott H, Wilson M. Community Structure and Co-Operation in Biofilms. *Society for General Microbiology Symposium 59.* 2000 ;
37. Høiby N, Bjarnsholt T, Givskov M, Molin S, Ciofu O. Antibiotic resistance of bacterial biofilms. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 2010 ;Abr;35(4):322-332.
38. Newman H, Wilson M. Dental Plaque Revisited: Oral Biofilms in Health and Disease. *Bioline.*
39. Marsh P. Oral ecology and its impact on oral microbial diversity; in Kuramitsu HK, Ellen RP (eds): *Oral Bacterial Ecology: The Molecular Basis.* Wymondham,: 2000.
40. Li J, Helmerhorst E, Corley R, Luus L, Troxler L, Oppenheim F. Characterization of the immunologic responses to human in vivo acquired enamel pellicle as a novel means to investigate its composition. *Oral Microbiol Immunol.* 2003 ;18:183–191.
41. Kolenbrander P, Andersen R, Kazmerak K, Palmer R. Coaggregation and coadhesion in oral biofilms; in Allison DG, Gilbert P, Lappin-Scott HM, Wilson M (eds): *Community Structure and Co-Operation in Biofilms.* Society for General Microbiology Symposium 59. 2000.
42. Allison D. The biofilm matrix. *Biofouling.* 2003 ;19:139–150.
43. Zijnga V, Leeuwen MBM van, Degener JE, Abbas F, Thurnheer T, Gmür R, et al. Oral biofilm architecture on natural teeth. *PloS one.* 2010 Jan ;5(2):e9321.
44. Yao Y, Berg E, Costello C, Troxler R, Oppenheim F. Identification Of Protein Components In Human Acquired Enamel Pellicle And Whole Saliva Using Novel Proteomics Approaches. *J Biol Chem.* 2003 ;278:5300–5308.

45. McFarland L. Normal flora: Diversity and functions. Microb Ecol Health Dis. 2000 ;12193-207.
46. Bagg J, McFarlane T, Poxton R, Smith J. Essentials of Microbiology for dental Students. second edi. 2006.
47. Loesche W. Chemotherapy of dental plaque infections. Oral Sci Rev. 1976 ;963-107.
48. Marsh P. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? Microbiology. 2003 ;149279-94.
49. Theilade E. The non-specific theory in microbial etiology of inflammatory periodontal diseases. J Clin Periodontol. 1986 ;13905-911.
50. Marsh P. Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease. Adv Dent res. 1994 ;8263-271.
51. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. Journal of clinical periodontology. 1998 Feb ;25(2):134-44.
52. Haffajee a D, Socransky SS, Patel MR, Song X. Microbial complexes in supragingival plaque. Oral microbiology and immunology. 2008 Jun ;23(3):196-205.
53. Komiya Ito A, Ishihara K, Tomita S, Kato T, Yamada S. Investigation of subgingival profile of periodontopathic bacteria using polymerase chain reaction. The Bulletin of Tokyo Dental College. 2010 Jan ;51(3):139-44.
54. Kigure T, Saito A, Seida K, Yamada S, Ishihara K, Okuda K. Distribution of Porphyromonas gingivalis and Treponema denticola in human subgingival plaque at different periodontal pocket depths examined by immunohistochemical methods. J Periodontal Res. 1995 ;30332–341.
55. Noiri Y, Li L, Yoshimura F, Ebisu S. Localization of Porphyromonas gingivalis-carrying fimbriae in situ in human periodontal pockets. J Dent Res. 2004 ;83941–945.
56. Zambon J. Periodontal diseases: Microbial factors. Ann Periodontol. 1996 ;1879-925.
57. Kesic L, Milasin J, Igic M, Obradovic R. Microbial etiology of periodontal disease– mini review. Medicine. 2008 ;15(1):1 - 6.
58. Haffajee A, Teles R, Socransky S. The effect of periodontal therapy on the composition of the subgingival microbiota. Periodontol 2000. 2006 ;42219–258.

59. Fernandez y Mostajo M, Zaura E, Crielaard W, Beertsen W. Does routine analysis of subgingival microbiota in periodontitis contribute to patient benefit? *European Journal of Oral Sciences*. 2011 May ;(17):no-no.
60. Ximenez-Fyvie L, Haffajee A, Socransky S. Comparison of the microbiota of supra- and subgingival plaque in health and periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000. 27:648–657.
61. Avila-Campos M. PCR detection of four periodontopathogens from subgingival clinical samples. *J Microbiol*. 2003 ;34:81-84.
62. Amornchat C, Rassameemasmaung S, Sripairojthikoon W, Swasdison S. Invasion of *Porphyromonas gingivalis* into human gingival fibroblasts in vitro. *J Int Acad Periodontol*. 2003 ;5:98-105.
63. Holt S, Kesavalu L, Walker S, Genco C. Virulence factors of *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontol* 2000. 1999 ;20:168- 238.
64. Lafaurie GI, Contreras A, Barón A, Botero J, Mayorga-Fayad I, Jaramillo A, et al. Demographic, clinical, and microbial aspects of chronic and aggressive periodontitis in Colombia: a multicenter study. [Internet]. *Journal of periodontology*. 2007 Apr ;78(4):629-39. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17397309>
65. Ezzo P, Cutler C. Microorganisms as risk indicators for periodontal disease. *Periodontol* 2000. 2003 ;32:24-35.
66. Czuprynski C. Modulation of leukocytes by endotoxins produced by HAP organisms. In: Haimophilus, Actinobacillus and Pasteurella. Plenum press. 1995 ;.143-152.
67. Kornman KS. Host modulation as a therapeutic strategy in the treatment of periodontal disease. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 1999 Mar ;28(3):520-6.
68. Thanassi DG, Hultgren SJ. Multiple pathways allow protein secretion across the bacterial outer membrane. *Current opinion in cell biology*. 2000 Aug ;12(4):420-30.
69. Kinney J, Ramseier A, Giannobile W. Oral Fluid-Based Biomarkers of Alveolar Bone Loss in Periodontitis. October. 2008 ;1-18.
70. Weinberg A, Belton C, Park Y, Lamont R. Role of fimbriae in *Porphyromonas gingivalis* invasion of gingival epithelial cells. *Infect Immun*. 1997 ;65:313-316.
71. Mantyla P, Stenman M, Kinane D. Gingival crevicular fluid collagenase-2 (MMP-8) test stick for chair-side monitoring of periodontitis. *J. Periodontal Res*. 2003 ;38:436–439.

72. Kornman K, Page R, Tonetti M. The host response to the microbial challenge in periodontitis: assembling the players. *Periodontol 2000*. 1997 ;1433–53.
73. Ozmeric N. Advances in periodontal disease markers. *Clin. Chim. Acta*. 2004 ;3431–16.
74. Haffajee AD, Yaskell T, Torresyap G, Teles R, Socransky SS. Comparison between polymerase chain reaction-based and checkerboard DNA hybridization techniques for microbial assessment of subgingival plaque samples. *Journal of clinical periodontology*. 2009 Aug ;36(8):642-9.
75. Armitage G. Comparison of the microbiological features of chronic and aggressive periodontitis. *Periodontol 2000*. 2010 ;5370–88.
76. Lederberg J, McCray A. 'Ome sweet 'omics – a genealogical treasury of words. *Scientist*. 2001 ;158–10.
77. Wade W. Has the use of molecular methods for the characterization of the human oral microbiome changed our understanding of the role of bacteria in the pathogenesis of periodontal disease? *J Clin Periodontology*. 2011 ;38 (Suppl.7–16).
78. Keijse RB, Zaura E, Huse S, Van Der Vossen J, Schuren F, Montijn R, et al. Pyrosequencing analysis of the oral microflora of healthy adults. *J Dent Res* . 2008 ;871016–1020.
79. Zaura E, Keijser B, Huse S, Crielaard W. Defining the healthy “core microbiome” of oral microbial communities. *BMC Microbiol* . 2009 ;9259.
80. Haffajee AD, Teles RP, Patel MR, Song X, Veiga N, Socransky SS. Factors affecting human supragingival biofilm composition. I. Plaque mass. *Journal of periodontal research*. 2009 Aug ;44(4):511-9.
81. Friedrich M. Microbiome project seeks to understand human body microscopic residents. *JAMA*. 2008 ;300777–778.
82. Mombelli A, Cionca N, Almaghlouth A. Does adjunctive antimicrobial therapy reduce the perceived need for periodontal surgery? *Periodontol 2000*. 2011 ;55205–216.
83. Der Weijden F van, Slot D. Oral hygiene in the prevention of periodontal diseases: the evidence. *Periodontol 2000*. 2011 ;55104–123.
84. Moore W, Moore L. The bacteria of periodontal diseases. *Periodontol 2000*. 1994 ;566–77.
85. Tanner ACR, Listgarten MA, Ebersole JL, Strzempko MN. *Bacteroides forsythus* sp. nov., a slow-growing, fusiform *Bacteroides* sp. from human oral cavity. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 1986 ;36213–221.

86. Sakamoto M, Suzuki M, Umeda M, Ishika- Wa I, Benno Y. Reclassification of *Bacteroides forsythus* (Tanner et al. 1896) as *Tannerella forsythensis* corrig., gen. nov., comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 52, 841–8452, 841–849.
87. Lau L, Sanz M, Herrera D, Morillo JM, Martín C, Silva A. Quantitative real-time polymerase chain reaction versus culture: a comparison between two methods for the detection and quantification of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in subgingival plaque samp. *Journal of clinical periodontology*. 2004 Dec ;31(12):1061-9.
88. Chen C, Slots J. Microbiological tests for *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis*. *Periodontology* 2000. 1999 ;20, 53–6420, 53–64.
89. Persing D, Tenover F, Versalovic J. *Molecular Microbiology*. 2004.
90. Mullis K. the unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci. Am*. 1990 ;26256-61.
91. Saiki K. enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985 ;2301350-1354.
92. Jordan R, Daniels T, Greenspan J, Regezi J. Advanced diagnostic methods in oral and maxillofacial pathology. Part I: molecular methods. *Oral Maxillofac Pathol*. 2001 ;92(6):650-69.
93. Santos C, Sakai V, Machado M, Schippers D, Greene A. Reverse Transcription and Polymerase applications in dentistry. *J Appl Oral Sci*. 2004 ;1(12):1-11.
94. Sanz M, Lau L, Herrera D, Morillo JM, Silva A. Methods of detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, *Porphyromonas gingivalis* and *Tannerella forsythensis* in periodontal microbiology, with special emphasis on advanced molecular techniques: a review. *J Clin Periodontol*. 2004 ;311034-1047.
95. Riggio MP, Macfarlane TW, Mackenzie D, Lennon A, Smith AJ, Kinane D. Comparison of polymerase chain reaction and culture methods for the detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *Porphyromonas gingivalis* in subgingival plaque samples. *Journal of Periodontal Research*. 1996 ;31496–501.
96. Haffajee AD, Yaskell T, Torresyap G, Teles R, Socransky SS. Comparison between polymerase chain reaction-based and checkerboard DNA hybridization techniques for microbial assessment of subgingival plaque samples. [Internet]. *Journal of clinical periodontology*. 2009 Aug ;36(8):642-9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19563330>

97. Mätto J, Saarela M, Alaluusua S, Oja V. Detection of *Porphyromonas gingivalis* from saliva by PCR by using a simple sample-processing method. *J. Clin. Microbiol.* 1998 ;1(36):157-60.
98. Hayashi F, Okada M, Zhong X. PCR detection of *capnocytophaga* species in dental plaque samples from children aged 2 to 12 years. *Microbiol Immunol.* 2001 ;1(45):17-22.
99. Kimura S, Ooshima T, Takiguchi T, Sasaki Y, Amano A. Periodontopathic bacterial infection in childhood. *J. Periodontol.* 2002 ;1(73):20-6.
100. Okada M, Hayashi F, Nagasaka N. Detection of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* and *porphyromonas gingivalis* in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. *J Clin Periodontol* 2000. 2000 ;10(27):763-8.
101. Okada M, Hayashi F, Nagasaka N. PCR detection of 5 putative periodontal pathogens in dental plaque samples from children 2 to 12 years of age. *J Clin Periodontol* 2000. 2001 ;6(28):576-82.
102. Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, I. Detection of *Treponema Socranskii* associated with human periodontitis by PCR. *Microbiol Immunol.* 2001 ;1(45):485-90.
103. Boutaga K, Savelkoul PH, Winkel EG, Winkelhoff AJ van. Comparison of subgingival bacterial sampling with oral lavage for detection and quantification of periodontal pathogens by real-time polymer- ase chain reaction. *Journal of Periodontology.* 2007 ;7879–86.
104. Boutaga K, Winkelhoff, A. J., Vanden- Broucke-Grauls CMJE van, Savelkoul PHM. Comparison of real-time PCR and culture for the detection of *Porphyromo- nas gingivalis* in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Microbiology.* 2003 ;414950– 4954.
105. Boutaga K, Van Winkelhoff, A. J., Vanden- Broucke-Grauls CM, Savelkoul PH. Periodontal pathogens: a quantitative comparison of anaerobic culture and real-time PCR. *FEMS Immunology & Medical Microbiology.* 2005 ;45191–199.
106. Boutaga K, Van Winkelhoff, A. J., Vanden- Broucke-Grauls CM, Savelkoul PH. The additional value of real-time PCR in the quantitative detection of periodontal pathogens. *Journal of Clinical Perio- dontology.* 2006 ;33427–433.
107. Jervoe-Storm, P. M., Koltzsch M, Falk W, Dorfler A, Jepsen S. Comparison of culture and real-time PCR for detection and quantification of five putative period- ontopathogenic bacteria in subgingival plaque samples. *Journal of Clinical Perio- dontology.* 2005 ;32778–783.
108. Sakamoto M, Takeuchi Y, Umeda M, Ishikawa I, Benno Y. Rapid detection and quantification of five periodontopathic bacteria by real time PCR. *Microbiol Immunol.* 2001 ;1(45):39-44.

109. Lyons S, Griffen A, Leys E. Quantitative real-time PCR for *Porphyromonas gingivalis* and total bacteria. *J Clin Microbiol.* 2000 ;6(38):2362-5.
110. Santos NBMD. Protocolos de diagnóstico de Doença Periodontal Baseados na evidência Científica. 2010 ;49.
111. Komiya Ito A, Ishihara K, Tomita S, Kato T, Yamada S. Investigation of subgingival profile of periodontopathic bacteria using polymerase chain reaction. *The Bulletin of Tokyo Dental College.* 2010 Jan ;51(3):139-44.
112. K YH, N T, He T UM, I. I. Prevalence of *B. forsythus*, *P. gingivalis* and *A. actinomycetemcomitans* in subgingival micro- flora of Japanese patients with adult and rapidly progressive periodontitis. *J Clin Periodontol* 2000. 27(.):597-602.
113. Gajardo M, Silva N, Gomez L. Prevalence of periodontopathic bacteria in aggressive periodontitis patients in a Chilean population. *J Periodontol.* 2005 ;76:289-294.

VII. Anexos

Anexo I

Declaração de Consentimento informado

Informação para o paciente

Termo de Autorização

Pretende-se realizar um estudo em pacientes seleccionados, na consulta de Periodontologia, da Clínica Universitária do Centro Regional das Beiras, da Universidade Católica Portuguesa, com o objectivo de obter dados relevantes ao desenvolvimento de uma tese de monografia, no âmbito do Mestrado Integrado em Medicina Dentária, onde será realizada uma recolha de ADN e microflora subgingival para posterior análise laboratorial.

Os dados que constam na ficha clínica serão apenas utilizados pelo investigador.

A informação recolhida será tratada com a máxima confidencialidade, sendo o seu nome codificado e tendo apenas o investigador acesso a essa mesma informação.

A investigação tem como responsáveis a Professora Doutora Maria José Correia, Mestre Nuno Santos e a aluna Ana Bárbara Bessa.

Eu, _____ autorizo
que os dados do meu processo sejam usados para este estudo e declaro que fui devidamente
informado(a) e esclarecido(a).

Assino este documento de livre e espontânea vontade, estando ciente do seu conteúdo

Viseu, ____ de _____ 2010

(Professora Doutora Maria José Correia)

(Ana Bessa)

(Paciente)

Anexo II

Folha de Laboratório

Microbiology

Processo nº _____

Diagnóstico actual _____

Aluno/ Médico _____

Observações:

--

Pedido de identificação:

- ☐ *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*
- ☐ *Prevotella intermédia*
- ☐ *Porphyromonas gingivalis*

Amostra 1

Dente: _____ Bolsa periodontal: _____ Profundidade de sondagem: _____
Recessão: _____

Amostra 2

Dente: _____ Bolsa periodontal: _____ Profundidade de sondagem: _____
Recessão: _____

Amostra 3

Dente: _____ Bolsa periodontal: _____ Profundidade de sondagem: _____
Recessão: _____

* (Código a escrever no tubo: nº processo/ nº da amostra, ex: 1000/A1)

Anexo III

Protocolo de colheita:

(A recolha microbiana deverá ser realizada em bolsas periodontais profundas, assim como em sulcos dentários, que não apresentem sinais clínicos de doença periodontal)

- Remover a placa bacteriana da superfície do dente e do sulco gengival, com uma bolinha de algodão estéril, secar a superfície com ar.
- Abrir, suavemente, a bolsa gengival com a ajuda de um instrumento estéril, como sonda ou pinça.
- Inserir duas pontas de papel estéril até 3,5 mm no sulco gengival, até sentir alguma resistência durante 10 /30 segundos.
- Retirar as pontas de papel com o cuidado de não tocar em nenhuma das outras superfícies da boca para não haver contaminação. Guardar as pontas de papel nos tubos estéreis fornecidos.
- Processar as amostras o mais depressa possível ou congelá-las imediatamente.

(serão entregues dois tubos/ micro tubos um para colocação flora de bolsa periodontal profunda, outra para dente saudável)

Anexo IV

Protocolo 1 - Extração de DNA de amostras de biofilme sem purificação do DNA.

1. Partir de 0,5 ml de amostra
2. Centrifugar 10 min a 13.000 rpm.
3. Descartar o sobrenadante.
4. Ressuspender o *pellet* em 100µL de TRIS (pH8), 100µL de EDTA e 100µL de 0,5% Tween (vortex).
5. Adicionar 3 µL de solução de proteinase K.
6. Incubar 2 h, a 55°C.
7. Incubar 5 min, a 95°C.

Anexo V

Protocolo de reacção de PCR

- 5 µl de amostra adicionar 45µl de master mix, (10 Mg²⁺, 50 mMGC1, dNTPs, *Primer* específico 1 µl foard e *primer* reverse 1µl, Taq)
- Colocar as amostras no termociclador respeitando o seguinte programa:
 - Desnaturação inicial 10 min a 95°C
 - Desnaturação 30 seg. 95°C
 - Annealing 1 min 60°C a 30 seg
 - Extensão do *primer* a 72 °C durante 1 min
 - Extensão final 72° C 10 min
- Repetir a sequência 32 vezes

Protocolo utilizado para a realização de gel de agarose a 2%

- 60 ml, de TAE + 1,20g de agarose;
- Colocação desta solução 3 min no microondas até á sua completa dissolução, agitar de 30 em 30 s, deixar arrefecer até à temperatura de 60 °C;
- Adicionar 3 µl de brometo de etídeo.

As soluções preparadas foram carregadas contendo 6 µl de amostra e 1 µl de corante de carregamento.

Anexo VI

amostra	processo	dente	bolsa	PD	Pg	Ag	Pi	Obs
1	16738	16	p	3				
2	16738	41	dv	2				
3	21998	14	p	5				
4	21998	45	v	2				
5	21289	25	p	4				
6	21289	35	v	1				
7	21289	11	dv	2				
8	21289	25	p	6				
9	21289	35	v	1				
10	21289	11	dv	4				
11	21124	26	p	4	Desapareceu			
12	21124	11	mp	2				
13	20178	16	v	1				
14	20178	16	mp	4				
15	20178	23	v	2	Desapareceu			
16	20178	35	v	1				
17	20178	34	v	1				
18	20178	34	l	2				
19	20178	44	v	2				
20	21069	33		4				
21	21069	44		4				
22	21047	21	mv	5				
23	21047	15	mv	3	Desapareceu			
24	21393	15	MV	12	Negativo a 6-Jun	Negativo a 31-Maio		
25	21393	46	dv	14	Desapareceu			
26	21393	46	furca		Negativo a 6-Jun	Negativo a 31-Maio		
27	21393	22	mv	3	Negativo a 6-Jun	Negativo a 31-Maio		
28	21288	16		3				
29	21288	12		3				
30	21027	41		8				
31	21027	45		2				
32	21027	11		4				
33	21678	16		6				
34	21678	11		3				
35	21678	25		5				
36	21856	48	dl	7				
37	21856	11	mv	2				

38	21856	23	mv	4				
39	21467	16		5				
40	21467	26		5				
41	20800	12		3	Desapareceu			
42	20800	26		4				
43	21736	13		10				
44	21736	46		8				
45	21736	36		5				
46	21736	35		3				
47	21655	34	ml	3	Negativo a 6-Jun	Negativo a 31-Maio		
48	21655	16	dv	9	Negativo a 6-Jun	Negativo a 31-Maio		
49	21655	11	mv	7	Desapareceu			
50	21655	27	mv	7	Negativo a 6-Jun	Negativo a 31-Maio		
51	21655	34	ml	6	Negativo a 6-Jun	Negativo a 31-Maio		
52	21655	16	dv	9	Negativo a 6-Jun	Negativo a 31-Maio		
53	21655	11	mv	7	Negativo a 6-Jun	Negativo a 31-Maio		
54	21655	27	mv	7	Negativo a 6-Jun	Negativo a 31-Maio		
55	22324	47	dv	5				PCL
56	22324	44	dv	6				PCL
57	22324	23	dl	5				PCL
58	21759	26	v	5				PCMG
59	21759	25	l	4				PCMG
60	22275	13		4				PCAL
61	22275	23		5				PCAL
62	22122	18		4				PCAG
63	22122	17		2				PCAG
64	21751	23		5				PCAG
65	21751	45		6				PCAG



Volume de recolha 0,5 ml e volume de extracção 30 µl



Cones de guta

Anexo VII

Questionário de satisfação

1 = Muito Insatisfeito, 2 = Insatisfeito, 3 = Satisfeito e 4 = Muito Satisfeito.

Satisfação com:		Registo de sugestões				
		1	2	3	4	
Metodologia Utilizada	Folha de requisição					
	Processo de recolha					
Utilidade para a consulta de Periodontologia	Utilidade para o diagnóstico					
	Utilidade para elaboração do plano de tratamento					

Anexo VIII

Data	Amostras	Procedimentos	Resultados	Observações
12/11/2010	Amostras de 2009	Protocolo de isolamento (anexo Z)	Presença de DNA	
10- 16/05/2011	Amostras de 2010/2011	Protocolo de isolamento (anexoZ)	_____	
24/05/2011	Amostras de 2010/11 já isoladas	Reacção de PCR para presença de <i>A.a</i>	Sem amplificação observada	Não se visualizou a presença do microorganismo na amostra
26- 31/05/2011	Amostras de 2010/11 já isoladas	Reacção de PCR com <i>primers</i> Box A1 e universal	Sem amplificação observada	Formulou-se a hipótese do DNA se encontrar muito diluído
1- 3/06/2011	Amostras de 2010/11 já isoladas	Reacção de PCR para presença de <i>P.g</i>	Obteve-se a apenas amplificação no controlo positivo	Indica amostras negativas.
6- 7/06/2011	Amostras de 2010/2011	Novo isolamento com protocolo alterado anexo Z		
6- 7/06/2011	Amostras de 2010/11 isolamento com protocolo z; amostras de 2009 e amostras frescas	Reacção de PCR para <i>P.g</i> e <i>A.a</i>	Não se visualiza <i>P.g</i> nem <i>A.a</i> mas existe DNA nas amostras	Levanta a questão será DNA bacteriano?
9/06/2011	Amostras utilizadas nos dias 6 e 7 de junho	Reacção de PCR com <i>primer</i> Box	Não existe amplificação mas continua a se visualizar DNA	Levanta a questão será humano? Ou o <i>primer</i> não estará correcto?
13/06/2011	Novas amostras, recolhidas com cones de guta e papel	Isolamento de DNA em menos volume e confirmação com electroforese de presença de DNA	DNA visível em aproximadamente 8 amostras	
14/06/2011	Amostras do dia 13/06 isoladas em menos volume	Reacção de PCR para presença de <i>P.g</i>	Não se visualizou o controlo positivo, mas visualizou-se DNA	Erro do operador?
15/06/2011	Amostras do dia 14/06 com DNA visível	Reacção de PCR para <i>P.g</i>	Visualização apenas do controlo positivo	Amostras negativas para <i>P.g</i> .

Anexo IX

- I. Gengivite;
- II. Periodontite Crónica;
- III. Periodontite Agressiva;
- IV. Periodontite como Manifestação de Doenças Sistémicas;
- V. Doenças Periodontais Necróticas;
- VI. Abscessos do Periodonto;
- VII. Periodontite associada a Lesões Endodônticas;
- VIII. Condições e Defomações Adquiridas ou de Desenvolvimento.

Tipo I- Gengivite

Doenças gengivais induzidas por placa.

- **Gengivite associada unicamente por placa:**
 - 1. Gengivite induzida por placa sem outros factores adicionais;
 - 2. Gengivite induzida por placa com presença de factores que contribuem para a doença periodontal;
- **Gengivite induzida por placa, modificada por factores sistémicos.**
 - Associados ao sistema endócrino:
 - 1. Gengivite pubertária;
 - 2. Gengivite associada ao ciclo menstrual;
 - 3. Gengivite associada á gravidez:
 - Gengivite gravídica;
 - Granuloma piogénico gravídico.
 - 4. Gengivite associada a diabetes mellitus.
 - Associada a discrasias sanguíneas:
 - 1. Gengivite associada a leucemias;
 - 2. Outras discrasias sanguíneas.
- **Gengivite induzida por placa, modificada por medicamentos**
 - Doenças gengivais influenciadas por medicação:
 - 1. Hiperpalsias gengivais;
 - 2. Gengivite influenciada por medicação:
 - Gengivite associada a contraceptivos;
 - Gengivite associada a outras medicações;

- **Gengivite induzida por placa, modificada por má-nutrição**
 - Gengivite associada a deficit de ácido ascórbico (escorbuto);
 - Outras gengivites modificadas por má-nutrição.

Lesões gengivais não induzidas por placa

- **Doenças gengivais de origem bacteriana específica**
 - *Neisseria gonorrhea*
 - *Treponema pallidum*
 - Lesões associadas a *Streptococcus*
 - *Mycobacterium tuberculosis*
 - Outras
- **Doenças gengivais de origem viral**
 - Por infecção com herpes
 - Gengivo-estomatite Herpética primária
 - Herpes oral recorrente
 - Infecção por *Varicella zooster*
 - Por outros vírus
- **Doenças gengivais induzidas por fungos**
 - Por Candidíase
 - Candidíase gengival generalizada
 - Eritema gengival linear
 - Histoplasmose
 - Outros
- **Doenças gengivais de origem genética**
 - Fibromatose Gengival Hereditária
 - Outras lesões gengivais de origem genética
- **Manifestações gengivais de condições sistémicas**
 - Manifestações gengivais de condições Sistémicas
 - Líquen plano
 - Penfigóide
 - Pênfigo *vulgaris*
 - Eritema multiforme
 - Lúpus eritematoso

- Granulomatose de Wegener's
 - Psoríase
 - Manifestações gengivais de condições sistémicas por drogas/medicamentos
 - Outras
- **Lesões gengivais decorrentes de manifestações alérgicas**
 - Materiais restauradores
 - Mercúrio
 - Níquel
 - Acrílico
 - Outros
 - Reacções atribuíveis a:
 - Pasta de dentes
 - Colutórios
 - Aditivos de pastilhas elásticas
 - Alimentos e aditivos
 - Outras causas de reacções alérgicas
- **Lesões traumáticas da gengiva**
 - Agressão química
 - Agressão física
 - Agressão térmica
- **Lesões gengivais por reacção “reacção corpo estranho”**
- **Não especificadas de outra forma**

Tipo II- Periodontite Crónica

- Tipo II A Localizada
- Tipo II B Generalizada

Tipo III- Periodontite Agressiva

- Tipo III A localizada
- Tipo III B Generalizada

Tipo IV- Periodontite como manifestação de doenças sistêmicas

- **Associada com desordens hematológicas**
 - Neutropenia adquirida
 - Leucemia
 - Associada com outras patologias hematológicas
- **Associada com desordens genéticas**
 - Neutropenia cíclica e familiar
 - Síndrome de Down
 - Síndromes de adesão deficitária dos leucócitos
 - Síndrome de Papillon-Lefèvre
 - Síndrome de Chediak-Higashi
 - Síndromes de Histiocitoses
 - Doença do armazenamento de glicogénio
 - Agranulocitose crónica
 - Síndrome de Cohen
 - Granulomatose crónica
 - Doença das células de Langerhans
 - Síndrome Ehlers-Danlos
 - Hipofosfatasia
 - Doença de Crohn
 - Síndrome de Marfan
 - Outras
- **Não especificadas de outra forma**

Tipo V- Patologia periodontal ulcerativa necrosante

- Gengivite ulcerativa necrosante
- Periodontite ulcerativa necrosante

Tipo VI- Abscessos do periodonto

- Abscessos gengivais
- Abscessos periodontais
- Abscessos pericoronários

Tipo VII- Lesões Perio- endodônticas

- Lesões endodônticas / periodonticas
- Lesões Periodonticas / endodônticas
- Lesões combinadas

Tipo VIII- Condições e deformidades adquiridas ou de desenvolvimento

- **Factores dentários localizados que predisõem para gengivite ou periodontite induzida por placa.**
 - Factores anatómicos dentários
 - Restaurações dentárias ou aparelhos
 - Fracturas radiculares
 - Reabsorções radiculares e “lágrimas” cementárias
- **Deformações mucogengivais e condições peridentárias**
 - Recessões gengivais
 - Vestibulares ou palatinas
 - Interproximais (papilares)
 - Falta de gengiva aderida
 - Falta de profundidade do vestíbulo
 - Poisção aberrante de freios ou músculos
 - Excesso gengival
 - Pseudo bolsas
 - Margem gengival inconsistente
 - Excessiva mostra gengival
 - Aumento gengival
 - Cor anormal
- **Problemas mucogengivais relacionados com cristas alveolares edêntulas**
 - Deficiência vertical ou horizontal da crista alveolar
 - Falta de gengiva/tecido queratinizado
 - Freios ou músculos em posição aberrante
 - Falta de profundidade do vestíbulo
 - Cor anormal

Trauma oclusal

VIII. Índice de Figuras e Tabelas

Figura nº1 –Gel de electroforese relativo à análise de <i>Porphyromonas gingivalis</i> com MM- Marcador de peso molecular; CP- Controlo positivo a) Amostras 1 a 3 de placa subgengival e b) Amostras 4 a 8 de placa subgengival.....	31
Figura nº2 – Gel de electroforese relativo à análise <i>P. gingivalis</i> . Amostras 55 – 61 de placa subgengival sem amplificação mas com ADN visível em 56, 57 e 59. MM- Marcador de peso molecular; CP- Controlo positivo.....	34
Figura nº3 – Gel de electroforese relativo à amplificação com <i>primer</i> Box 1. Amostras de culturas puras de <i>E. coli</i> e <i>Lactobacillus</i> Amarela e Branca . Visível amplificação de <i>E. coli</i> . MM- Marcador de peso molecular.....	35
Figura nº 4 -análise global dos questionários.....	35
Figura nº 5 - análise do campo referente à folha de requisição.....	36
Figura nº 6 -análise do campo referente à folha de recolha.....	36
Tabela 1- Factores de risco e determinantes associadas à doença periodontal.....	6
Tabela 2- Prevalência de <i>P.gingivalis</i>	12
Tabela 3- Prevalência de <i>A. actinomycetemcomitans</i>	16
Tabela 5- Testes de hibridização disponíveis no mercado.....	24

